



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

(11) PI 0011407-3 B1

(22) Data do Depósito: 23/05/2000

(45) Data de Concessão: 25/09/2018



(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO QUIMÉRICA, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, SISTEMA DE VETOR HOSPEDEIRO, E, MÉTODOS DE PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/12; C12N 15/62; C12N 5/10; C07K 14/71; A61K 38/17; A61P 43/00

(30) Prioridade Unionista: 08/06/1999 US 60/138133

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(72) Inventor(es): NICHOLAS J. PAPADOPOULOS; SAMUEL DAVIS; GEORGE D. YANCOPOULOS

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/12/2001

“MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO QUIMÉRICA, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, SISTEMA DE VETOR HOSPEDEIRO, E, MÉTODO DE PRODUZIR UM POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO”

O pedido reivindica a prioridade do Pedido Provisório U.S. Nº 60/138.133, depositado em 8 de junho de 1999. Por todo este pedido várias publicações são dadas como referência. As divulgações destas publicações em suas totalidades são aqui incorporadas por referência neste pedido.

INTRODUÇÃO

O campo desta invenção são polipeptídeos modificados com farmacocinéticas melhoradas. Especificamente, o campo desta invenção diz respeito a polipeptídeos do receptor Flt1 que tenham sido modificados de tal modo que melhorem o seu perfil farmacocinético. O campo desta invenção também diz respeito a métodos de fabricar e usar os polipeptídeos modificados incluindo mas não limitado a usar os polipeptídeos modificados para diminuir ou inibir o vazamento de plasma e/ou a permeabilidade vascular em um mamífero.

FUNDAMENTOS

A capacidade dos ligantes de polipeptídeo para ligarem-se a células e deste modo evocar uma resposta fenotípica tal como o desenvolvimento celular, sobrevivência, secreção de produto celular, ou diferenciação celular é freqüentemente mediada através dos receptores transmembrana nas células. O domínio extracelular de tais receptores (isto é, aquela porção do receptor que é demonstrada na superfície da célula) é, no geral, a parte mais distinta da molécula, visto que fornece a proteína com a sua ligação de ligante característica. A ligação de um ligante ao domínio extracelular, no geral, resulta na transdução de sinal que transmite um sinal biológico aos alvos intracelulares. Freqüentemente, esta transdução de sinal atua por intermédio de um domínio intracelular catalítico. A disposição particular de motivos de seqüência deste domínio intracelular catalítico determina o seu acesso aos substratos de quinase potenciais (Mohammadi, *et*

al., 1990, *Mol. Cell. Biol.* 11: 5068 a 5078; Fantl, *et al.*, 1992, *Cell* 69: 413 a 413). Os exemplos de receptores que transduzem sinais por intermédio dos domínios intracelulares catalíticos incluem os receptores de tirosina quinases (RTKs) tal como a família Trk de receptores que são, no geral, limitados às células do sistema nervoso, a família citocina de receptores incluindo o complexo de receptor CNTF de tripartato (Stahl & Yancopoulos, 1994, *J. Neurobio.* 25: 1454 a 1466) que também está, no geral, limitado às células do sistema nervoso, os receptores ligados à proteína G, tais como o receptor adrenérgico P2 encontrado, por exemplo, nas células do músculo cardíaco, e o receptor multimérico IgE de alta afinidade FcεRI que está localizada, na maior parte, em mastóides e basófilos (Sutton & Gould, 1993, *Nature* 366: 421 a 428).

Todos os receptores até agora identificados parecem sofrer dimerização, multimerização, ou alguma mudança conformacional relacionada seguindo a ligação de ligante (Schlessinger, J., 1988, *Trend Biochem. Sci.* 13: 443 a 447; Ullrich & Schlessinger, 1990, *Cell* 61: 203 a 212; Schlessinger & Ullrich, 1992, *Neuron* 9: 383 a 391) e as interações moleculares entre domínios intracelulares de dimerização levam à ativação da função catalítica. Em alguns exemplos, tais como o fator de crescimento relacionado a plaqueta (PDGF), o ligante é um dímero que liga duas moléculas receptoras (Hart, *et al.*, 1988, *Science*, 240: 1529 a 1531; Heldin, 1989, *J. Biol. Chem.* 264: 8905 a 8912) enquanto, por exemplo, no caso do fator crescimento epidérmico (EGF), o ligante é um monômero (Weber, *et al.*, 1984, *J. Biol. Chem.* 259: 14631 a 14636). No caso do receptor FcεRI, o ligante, IgE, existe ligado ao FcεRI de uma maneira monomérica e apenas torna-se ativado quando o antígeno se liga ao complexo IgE/ FcεRI e reticula as moléculas de IgE adjacentes (Sutton & Gould, 1993, *Nature* 366: 421 a 428).

Freqüentemente, a distribuição de tecido de um receptor particular dentro de organismos superiores fornece discernimento da função

biológica do receptor. Os RTKs por causa de fatores de crescimento e diferenciação, tais como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), são amplamente expressados e portanto parecem desempenhar algum papel geral no crescimento e na manutenção de tecido. Os membros da família Trk RTK (Glass & Yancopoulos, 1993, Trends in Cell Biol. 3: 262 a 268) de receptores são, no geral, mais limitados às células do sistema nervoso, e a família do Fator de Crescimento de Nervo que consiste do fator de crescimento de nervo (NGF), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), da neurotrofina-3 (NT-3) e da neurotrofina-4/5 (NT-4/5), que ligam os receptores da família Trk RTK, promovem a diferenciação de diversos grupos de neurônios no cérebro e periferia (Lindsay, R. M, 1993, em Neurotrophic Factors, S. E. Loughlin & J. H. Fallon, eds., pp. 257 a 284, San Diego, CA, Academic Press). FcεRI está localizado em um número muito limitado de tipos de células tais como mastóides e basófilos. Os mastóides derivam da linhagem de célula tronco hematopoiética pluripotente da medula óssea, mas completam a sua maturação no tecido seguindo a migração a partir da corrente sangüínea (Ver Janeway & Travers, 1996, em Immunobiology, 2ª Edição, M. Robertson & E. Lawrence, eds., pp. 1:3 a 1:4, Current Biology Ltd., London, UK, Publisher) e estão envolvidas na resposta alérgica.

Muitos estudos têm demonstrado que o domínio extracelular de um receptor fornece a ligação de ligante específica característica. Além disso, o ambiente celular em que um receptor é expressado pode influenciar a resposta biológica exibida na ligação de um ligante ao receptor. Por exemplo, quando uma célula neuronal que expressa um receptor Trk é exposta a uma neurotrofina que liga a aquele receptor, resulta a sobrevivência e diferenciação neuronais. Quando o mesmo receptor é expressado por um fibroblasto, a exposição à neurotrofina resulta na proliferação do fibroblasto (Glass, *et al.*, 1991, Cell 66: 405 a 413).

Uma classe de mitógenos diméricos derivados de célula com seletividade para as células endoteliais vasculares foi identificada e designada

de fator de crescimento celular endotelial vascular (VEGF). O VEGF foi purificado do meio de crescimento condicionado de células de glioma de rato [Conn *et al.*, (1990), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 87. pp 2628 a 2632]; e do meio de crescimento condicionado de células estreladas do folículo pituitário bovino [Ferrara e Henzel, (1989), Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, pp. 851 a 858; Gozpadorowicz *et al.*, (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, pp. 7311 a 7315] e do meio de crescimento condicionado de células U937 humanas [Connolly, D. T. *et al.* (1989), Science, 246, pp. 1309 a 1312]. O VEGF é um dímero com uma massa molecular aparente de cerca de 46 kDa com cada subunidade tendo uma massa molecular aparente de cerca de 23 kDa. O VEGF tem algumas similaridades estruturais com o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), que é um mitógeno para as células do tecido conectivo mas não mitogênica para as células endoteliais vasculares de vasos grandes.

O receptor de tirosina quinase ligado a membrana, conhecido como Flt, mostrou ser um receptor VEGF [DeVries, C. *et al.*, (1992), Science, 255, pp. 989 a 991]. O receptor Flt especificamente liga o VEGF que induz a mitogênese. Uma outra forma do receptor de VEGF, designada KDR, também é conhecida ligar o VEGF e induz a mitogênese. A seqüência de cDNA parcial e quase a seqüência da proteína de comprimento completo do KDR são também conhecidas [Terman, B. I. *et al.*, (1991) Oncogene 6, pp. 1677 a 1683; Terman, B. I. *et al.*, (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 187, pp. 1579 a 1586].

A angiogênese persistente pode causar ou exacerbar certas doenças tais como psoríase, artrite reumatóide, hemangiomas, angiofibromas, retinopatia diabética e glaucoma neovascular. Um inibidor da atividade VEGF pode ser útil como um tratamento para tais doenças e outras condições patológicas de angiogênese e de permeabilidade vascular, tais como a vascularização de tumor. A presente invenção diz respeito a um inibidor de VEGF que é baseado no receptor Flt1 do VEGF.

O vazamento de plasma, um componente chave da inflamação, ocorre em um subconjunto distinto de microvasos. Em particular, na maioria dos órgãos o vazamento de plasma ocorre especificamente nas vênulas. Diferente das arteríolas e capilares, as vênulas tornam-se suscetíveis ao vazamento em resposta a numerosos mediadores inflamatórios incluindo a histamina, bradiquinina e serotonina. Uma característica da inflamação é o vazamento de plasma que resulta dos intervalos intracelulares que se formam no endotélio das vênulas. A maior parte dos modelos experimentais de inflamação indicam que estes intervalos intracelulares ocorrem entre as células endoteliais de vênulas pós capilares e de coleta (Baluk, P., *et al.*, Am. J. Patol. 1998 152: 1463 a 1476). Foi mostrado que certas lecitinas podem ser usadas para revelar características de sítios focais de vazamento de plasma, intervalos endoteliais, e processos semelhantes a dedo nas bordas da célula endotelial em vênulas inflamadas (Thurston, G., *et al.*, Am. J. Physiol, 1996, 271: H2547-62). Em particular, lecitinas vegetais foram usadas para visualizar mudanças morfológicas nas bordas da célula endotelial em vênulas inflamadas, por exemplo, da traquéia de rato. As lecitinas, tais como a conconavalina A e a ricina, que se ligam focalmente às vênulas inflamadas revelam regiões da parede de vaso subendotelial exposta por intervalos que correspondem aos locais de vazamento de plasma (Thurston, C., *et al.*, Am J Physiol, 1996, 271: H2547-62).

As propriedades dos microvasos são dinâmicas. Doenças inflamatórias crônicas, por exemplo, estão associadas com a remodelagem microvascular, incluindo a angiogênese e a ampliação de microvaso. Os microvasos também podem ser remodelados pela aquisição de propriedades fenotípicas anormais. Em um modelo de murino de inflamação crônica das vias aéreas, os capilares das vias aéreas adquirem propriedades de vênulas, incluindo o diâmetro de vaso alargado, imunorreatividade aumentada pelo fator de von Willebrand, e imunorreatividade aumentada para a P-seletina. Além disso, estes vasos remodelados vazam em resposta a mediadores

inflamatórios, ao passo que os vasos na mesma posição nas vias aéreas de camundongos normais não o fazem.

Certas substâncias mostraram diminuir ou inibir a permeabilidade vascular e/ou o vazamento de plasma. Por exemplo, as mistixinas são polipetídeos sintéticos que foram relatados inibir o vazamento de plasma sem bloquear a formação de intervalo endotelial (Baluk, P., *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther, 1998, 284: 693 a 699). Também, o agonista do receptor beta 2-adrenérgico, o formoterol reduz o vazamento microvascular pela inibição da formação do intervalo endotelial (Baluk, P. e McDonald, D. M., Am. J. Physiol., 1994, 266: L461-8).

As angiopoietinas e membros da família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são os únicos fatores de desenvolvimento considerados ser largamente específicos para as células endoteliais vasculares. Estudos de inativação de genes alvejados em camundongos mostraram que o VEGF é necessário para os estágios iniciais do desenvolvimento vascular e que Ang-1 é requerido para os estágios finais da remodelação vascular.

A Patente U.S. 6.011.003, concedida em 4 de janeiro de 2000, no nome de Metris Therapeutics Limited, divulga uma forma solúvel, alterada de polipeptídeo FLT que é capaz de ligação ao VEGF e deste modo exercer um efeito inibidor sobre este, o polipeptídeo compreende cinco ou domínios completos de imunoglobulina ou menos.

A Patente U.S. 5.712.380, concedida em 27 de janeiro de 1998 e designada a Merck & Co., divulga inibidores do fator de crescimento celular endotelial vascular (VEGF) que são formas solúveis de ocorrência natural ou recombinantemente engendradas com ou sem uma região de transmembrana de terminal C do receptor para VEGF.

Também designada à Merck & Co. é a Publicação PCT Nº WO 98/13071, publicada em 2 Abril de 1998, que divulga a metodologia da terapia de gene para inibição do desenvolvimento de tumor primário e de

metástase pela transferência de gene de uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de receptor solúvel que se liga ao VEGF.

A Publicação PCT Nº WO 97/44453, publicada em 27 de novembro de 1997, no nome de Genentech, Inc., divulga novas proteínas do receptor de VEGF quimérico que compreende sequências de aminoácido derivadas dos receptores Flt1 e KDR do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), incluindo o homólogo de murino para o receptor FLK1 do KDR humano, em que as ditas proteínas do receptor de VEGF quimérico ligam-se ao VEGF e antagonizam a sua atividade proliferativa e angiogênica de célula endotelial.

A Publicação PCT Nº WO 97/13787, publicada em 17 de abril de 1997, no nome da Toa Gosei Co., LTD., divulga um inibidor de baixo peso molecular do VEGF utilizável no tratamento de doenças acompanhadas pela neovascularização tais como a de tumores sólidos. Um polipeptídeo contendo o primeiro domínio semelhante à imunoglobulina e o segundo domínio semelhante à imunoglobulina na região extracelular de um receptor FLT do VEGF mas não contendo o seu sexto domínio semelhante à imunoglobulina e o sétimo domínio semelhante à imunoglobulina apresenta uma atividade de inibidor de VEGF.

Sharifi, J. *et al.*, 1998, The Quarterli Jour. de Nucl. Med. 42: 242 a 249, divulga que porque os anticorpos monoclonais (MAbs) são básicos, as proteínas positivamente carregadas e as células mamíferas são negativamente carregadas, as interações eletrostáticas entre as duas podem criar níveis mais altos de ligação de fundo que resulta em relações baixas de tumor para órgão normal. Para superar este efeito, os investigadores tentaram melhorar a liberação de MAb pelo uso de vários métodos tais como agentes secundários bem como modificações químicas e de carga do próprio MAb.

Jensen-Pippo, *et al.*, 1996, Pharmaceutical Research 13: 102 a 107, divulgam que a fixação de uma proteína terapêutica, o fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (PEG-G-CSF), resulta em

um aumento na estabilidade e na retenção da bioatividade *in vivo* quando administrada pela via intraduodenal.

Tsutsumi, *et al.*, 1997, Thromb Haemost. 77: 168 a 173, divulgam experimentos em que a atividade trombopoietica *in vivo* de interleucina-6 modificada por polietileno glicol (MPEG-IL-6), em que 54 % dos 14 grupos amino de lisina de IL-6 foram ligados com PEG, foi comparada àquela de IL-6 nativa.

Yang, *et al.*, 1995, Cancer 76: 687 a 694, divulgam que a conjugação de polietileno glicol à interleucina-2 humana recombinante (IL-2) resulta em um composto, a IL-2 modificada com polietileno glicol (PEG-IL-2) que retém a atividade *in vitro* e *in vivo* de IL-2, mas exibe uma meia vida circulante acentuadamente prolongada.

R. Duncan e F. Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290 a 306, 296 (1994) revisam esforços para melhorar a meia vida no plasma de asparaginase pela conjugação ao polietileno glicol.

A Publicação Internacional PCT Nº WO 99/03996 publicada em 28 de janeiro de 1999 no nome de Regeneron Pharmaceuticals, Inc. e de The Regents of The University of California descreve polipetídeos *noggin* humanos modificados tendo supressões de regiões de aminoácidos básicos. Os polipetídeos *noggin* humanos modificados são descritos como retentores da atividade biológica embora tendo afinidade reduzida à heparina e farmacocinéticas superiores nos soros animais quando comparados ao *noggin* humano não modificado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção está direcionada aos antagonistas de VEGF com propriedades farmacocinéticas melhoradas. Uma forma de realização preferida é uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica um polipeptídeo de fusão capaz de ligação a um polipeptídeo de VEGF que compreende (a) uma seqüência de nucleotídeo que codifica um componente do receptor de VEGF funcionalmente ligado a (b) uma seqüência de

nucleotídeo que codifica um componente de multimerização, em que o componente do receptor de VEGF é o único componente do receptor de VEGF do polipeptídeo de fusão e em que a sequência de nucleotídeo de (a) consiste essencialmente de uma sequência de nucleotídeo que codifica a
5 sequência de aminoácido do domínio 2 de Ig do domínio extracelular de um primeiro receptor de VEGF e uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido do domínio 3 de Ig do domínio extracelular de um segundo receptor de VEGF.

Em uma outra forma de realização, o ácido nucléico isolado do
10 primeiro receptor de VEGF é Flt1.

Em uma outra forma de realização, o ácido nucléico isolado do segundo receptor de VEGF é Flk1.

Já em uma outra forma de realização, o ácido nucléico isolado do segundo receptor de VEGF é Flt4.

15 Em uma outra forma de realização preferida, a sequência de nucleotídeo que codifica o domínio 2 de Ig do domínio extracelular do primeiro receptor de VEGF está a montante da sequência de nucleotídeo que codifica o domínio 3 de Ig do domínio extracelular do segundo receptor de VEGF.

20 Ainda em uma outra forma de realização preferida, a sequência de nucleotídeo que codifica o domínio 2 de Ig do domínio extracelular do primeiro receptor de VEGF está a jusante da sequência de nucleotídeo que codifica o domínio 3 de Ig do domínio extracelular do segundo receptor de VEGF.

25 Em uma forma de realização preferida da invenção, o componente de multimerização compreende um domínio de imunoglobulina.

Em uma outra forma de realização preferida, o domínio de imunoglobulina é selecionado do grupo que consiste do domínio Fc de IgG, da cadeia pesada de IgG, e da cadeia leve de IgG.

30 As formas de realização preferidas incluem uma molécula de

ácido nucléico isolada que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo de fusão do receptor Flt1 modificado, em que a região codificadora da molécula de ácido nucléico consiste de uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste de

5 (a) a seqüência de nucleotídeo apresentada nas Figuras de 13A a 13D (SEQ ID NO: 3);

(b) a seqüência de nucleotídeo apresentada nas Figuras de 14A a 14C (SEQ ID NO: 5);

10 (c) a seqüência de nucleotídeo apresentada nas Figuras de 15A a 15C (SEQ ID NO: 7);

(d) a seqüência de nucleotídeo apresentada nas Figuras de 16A a 16D (SEQ ID NO: 9);

(e) a seqüência de nucleotídeo apresentada nas Figuras de 21A a 21C (SEQ ID NO: 11);

15 (f) a seqüência de nucleotídeo apresentada nas Figuras de 22A a 22C (SEQ ID NO: 13);

(g) a seqüência de nucleotídeo apresentada nas Figuras de 24A a 24C (SEQ ID NO: 15); e

20 (h) uma seqüência de nucleotídeo que, como um resultado da degeneração do código genético, difere da seqüência de nucleotídeo de (a), (b), (c), (d), (e), (f), ou (g) e que codifica uma molécula de polipeptídeo de fusão tendo a atividade biológica do polipeptídeo de fusão do receptor Flt1 modificado.

25 Em uma outra forma de realização da invenção, um polipeptídeo de fusão é codificado pelas moléculas isoladas de ácido nucléico descritos acima.

Uma forma de realização preferida é uma composição capaz de ligar uma molécula de VEGF para formar um complexo não funcional que compreende um multímero do polipeptídeo de fusão.

30 Também preferida é uma composição em que o multímero é

um dímero.

Já em uma outra forma de realização, a composição está em um veículo.

Uma outra forma de realização é um vetor que compreende as moléculas de ácido nucléico descritas acima, incluindo um vetor de expressão que compreende uma das moléculas de ácido nucléico descrita em que a molécula de ácido nucléico está funcionalmente ligada a uma seqüência de controle de expressão.

Outras formas de realização incluídas são um sistema de vetor hospedeiro para a produção de um polipeptídeo de fusão que compreendo vetor de expressão, em uma célula hospedeira adequada; o sistema de vetor hospedeiro em que a célula hospedeira adequada é uma célula bacteriana, célula de levedura, célula de inseto ou célula de mamífero; o sistema de vetor hospedeiro em que a célula hospedeira adequada é o *E. Coli*; o sistema de vetor hospedeiro em que a célula hospedeira adequada é uma célula COS; o sistema de vetor hospedeiro em que a célula hospedeira adequada é uma célula CHO.

Uma outra forma de realização da invenção é um método de produzir um polipeptídeo de fusão que compreende cultivar células do sistema de vetor hospedeiro sob condições que permitam a produção do polipeptídeo de fusão e a recuperação do polipeptídeo de fusão assim produzido.

As formas de realização incluem um polipeptídeo de fusão codificado pela seqüência de ácido nucléico apresentada nas Figuras de 10A a 10D (SEQ ID NO: 1) ou nas Figuras de 24A a 24C (SEQ ID NO: 15), que foi modificada pela acetilação ou fixação em que a acetilação é realizada com um excesso molar de pelo menos 100 vezes do reagente de acetilação ou em que a acetilação é realizada com um excesso molar do reagente de acetilação variando de pelo menos cerca de um excesso molar de 10 vezes a cerca de um excesso molar de 100 vezes ou em que a fixação é 10K ou 20K PEG.

Uma forma de realização preferida inclui um método de diminuir ou inibir o vazamento de plasma em um mamífero que compreende administrar ao mamífero o polipeptídeo de fusão descrito acima, incluindo formas de realização em que o mamífero é um ser humano, o polipeptídeo de fusão é acetilado ou o polipeptídeo de fusão é polietileno glicolizado.

Uma outra forma de apresentação é um polipeptídeo de fusão que se liga especificamente ao ligante do receptor de VEGF.

Uma forma de realização preferida da invenção é um método de bloquear o desenvolvimento de vaso sangüíneo em um ser humano que compreende administrar uma quantidade eficaz do polipeptídeo de fusão descrito acima.

Também preferido é um método de inibir a atividade de ligante do receptor de VEGF em um mamífero que compreende administrar ao mamífero uma quantidade eficaz do polipeptídeo de fusão descrito acima.

As formas de realização preferidas destes métodos são aquelas em que o mamífero é um ser humano.

Outras formas de realização dos métodos da invenção incluem a atenuação ou prevenção do desenvolvimento de tumor em um ser humano; a atenuação ou prevenção de edema em um ser humano, especialmente em que o edema é edema cerebral; a atenuação ou prevenção de formação de ascite em um ser humano, especialmente em que a ascite é a ascite associada ao câncer do ovário.

As formas de realização preferidas da invenção incluem um polipeptídeo de fusão capaz de ligação a um polipeptídeo de VEGF que compreende (a) um componente do receptor de VEGF funcionalmente ligado a (b) um componente de multimerização, em que o componente do receptor de VEGF é o único componente do receptor de VEGF no polipeptídeo de fusão e consiste essencialmente da seqüência de aminoácido do domínio 2 de Ig do domínio extracelular de um primeiro receptor de VEGF e a seqüência de aminoácido do domínio 3 de Ig do domínio extracelular de um segundo

receptor de VEGF.

Em uma outra forma de realização do polipeptídeo de fusão, o primeiro receptor de VEGF é Flt1.

Já em uma outra forma de realização do polipeptídeo de fusão,
5 o segundo receptor de VEGF é Flk1.

Ainda uma outra forma de realização do polipeptídeo de fusão é uma em que o segundo receptor de VEGF é Flt4.

As formas de realização preferidas incluem um polipeptídeo de fusão em que a seqüência de aminoácido do domínio 2 de Ig do domínio
10 extracelular do primeiro receptor de VEGF está a montante da seqüência de aminoácido do domínio 3 de Ig do domínio extracelular do segundo receptor de VEGF e um polipeptídeo de fusão em que a seqüência de aminoácido do domínio 2 de Ig do domínio extracelular do primeiro receptor de VEGF está a jusante da seqüência de aminoácido do domínio 3 de Ig do domínio
15 extracelular do segundo receptor de VEGF.

Já em uma outra forma de realização, o componente de multimerização do polipeptídeo de fusão compreende um domínio de imunoglobulina incluindo uma forma de realização em que o domínio de imunoglobulina é selecionado do grupo que consiste do domínio Fc de IgG,
20 da cadeia pesada de IgG, e da cadeia leve de IgG.

As formas de realização preferidas incluem um polipeptídeo de fusão que compreende uma seqüência de aminoácido de um receptor Flt1 modificado, em que a seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste de (a) a seqüência de aminoácido apresentada nas Figuras de 13A a
25 13D (SEQ ID NO: 4); (b) a seqüência de aminoácido apresentada nas Figuras de 14A a 14C (SEQ ID NO: 6); (c) a seqüência de aminoácido apresentada nas Figuras de 15A a 15C (SEQ ID NO: 8); (d) a seqüência de aminoácido apresentada nas Figuras de 16A a 16D (SEQ ID NO: 10); (e) a seqüência de aminoácido apresentada nas Figuras de 21A a 21C (SEQ ID NO: 12); (f) a
30 seqüência de aminoácido apresentada nas Figuras de 22A a 22C (SEQ ID NO:

14); e (g) a sequência de aminoácido apresentada nas Figuras de 24A a 24C (SEQ ID NO: 16).

Uma outra forma de realização preferida é um método de diminuir ou inibir o vazamento de plasma em um mamífero que compreende administrar ao mamífero o polipeptídeo de fusão descrito acima.

Uma forma de realização alternativa preferida é um método de inibir a atividade de ligante do receptor de VEGF em um mamífero que compreende administrar ao mamífero uma quantidade eficaz do polipeptídeo de fusão descrito acima.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Análise em gel de IEF de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas e acetiladas. A proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada é incapaz de penetrar o gel devido ao seu $pI > 9,3$, ao passo que o Flt1(1-3)-Fc acetilado é capaz de penetrar o gel e equilibrar no pI 5,2.

Figura 2. Ligação de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas e Flt1(13)-Fc acetiladas a placas revestidas com Matrigel[®]. A proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada liga-se extensivamente aos componentes da matriz extracelular no Matrigel[®], ao passo que o Flt1(1-3)-Fc acetilado não se liga.

Figura 3. Ligação de Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3)Fc acetilada, e Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada em um ensaio com base em Biacore. As Flt1(1-3)-Fc acetiladas (colunas 13 a 16), polietileno glicolizadas (colunas 17 a 20), e tratadas com heparina (colunas 21 a 24) são cada uma capazes de competir completamente com a Flt1(1-3)-Fc ligada à lasca de Biacore para a ligação de VEGF quando comparado ao controle (colunas 1 a 4) e à proteína irrelevante (colunas 5 a 8). A Flt1(1-3)-Fc não modificada (colunas 5 a 6) parece competir apenas parcialmente com a Flt1(1-3)-Fc ligada à lasca de Biacore para a ligação de VEGF. Entretanto, lavar as amostras ligadas com NaCl 0,5 M (colunas 7 e 8) resulta em um perfil de ligação similar ao das formas modificadas de Flt1(1-3)Fc, indicando que a proteína não modificada está exibindo ligação não específica à lasca que pode

ser eliminada pela lavagem salina.

Figura 4. Ligação de Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3)-Fc acetilada, e Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada ao VEGF em um ensaio com base em ELISA. Tanto a proteína Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada quanto a acetilada ligam-se ao VEGF com afinidades que se aproximam daquelas da Flt1(1-3)-Fc não modificada.

Figura 5. Perfis farmacocinéticos de Flt1(1-3)-Fc não modificada, da Flt1(1-3)-Fc acetilada, e da Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada. camundongos Balb/c (2328 g) foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de Flt1(1-3)-Fc não modificada, acetilada ou polietileno glicolizada. Os camundongos foram sangrados na cauda em 1, 2, 4, 6, 24 horas, 2 dias e 3 dias depois da injeção de proteína e os soros foram ensaiados em um ensaio com base em ELISA padrão planejado para detectar a proteína Flt1(1-3)-Fc. A T_{max} para todas as proteínas Flt1(1-3)-Fcs foi entre os pontos de tempo de 6 horas e 24 horas. A C_{max} para as proteínas diferentes foi como segue: Não modificadas: 0,06 µg/ml a 0,15 µg/ml; acetilado: 1,5 µg/ml a 4,0 µg/ml; e polietileno glicolizado: aproximadamente 5 µg/ml.

Figuras 6A e 6B. Análises em gel de IEF de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas e acetiladas por etapa. A proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada é incapaz de penetrar o gel devido ao seu $pI > 9,3$, ao passo que a maior parte das amostras de Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa (amostras em excesso de 30 a 100 vezes) foram capazes de migrar no gel e de se equilibrarem em pIs variando entre 4,55 e 8,43, dependendo do grau de acetilação.

Figura 7. Ligação de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas e Flt1(1-3)-Fc acetiladas por etapa às placas revestidas com Matrigel®. Como com a proteína de controle irrelevante, rTie2-Fc, a Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa (amostras em excesso de 20 a 30 vezes) não exhibe qualquer ligação à placa revestida com Matrigel, ao passo que a proteína Flt1(1-3)-Fc não acetilada exhibe ligação significativa. A amostra de excesso de 10 vezes

apresenta ligação reduzida, mas o grau de acetilação não é suficiente para bloquear completamente a ligação aos componentes da matriz extracelular.

Figura 8. Ligação de Flt1(1-3)-Fc não modificada e Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa em um ensaio com base em Biacore. Em uma relação subestequiométrica (0,5 µg/ml de Flt1(1-3) não modificada ou Flt1(13)-Fc acetilada por etapa vs. 0,2 µg/ml de VEGF), não há Flt1(1-3)-Fc suficiente (seja não modificada ou acetilada por etapa) na solução para ligar completamente o VEGF. A 1,0 µg/ml, que aproxima-se a uma relação estequiométrica de 1:1, tanto a Flt1(1-3)-Fc não modificada quanto a acetilada por etapa são mais capazes de competir para a ligação do VEGF, mas ainda existe proteína Flt1(1-3)-Fc insuficiente (seja não modificada ou acetilada por etapa) para saturar completamente o VEGF disponível. Entretanto, a 5,0 µg/ml, que é várias vezes maior do que uma relação estequiométrica de 1:1, tanto a proteína Flt1(1-3)-Fc quanto a proteína Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa são capazes de saturar o VEGF, com respeito ao grau de acetilação.

Figura 9. Perfis farmacocinéticos de Flt1(1-3)-Fc não modificada e Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa. Camundongos Balb/c (23 a 28 g) foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de não modificadas ou amostras com excesso de 10, 20, 40, 60 e 100 vezes de Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa (3 camundongos para as amostras não modificadas, com excesso de 10, 20 e 40 vezes e 2 camundongos para excesso de 60 e 100 vezes). Os camundongos foram sangrados na cauda em 1, 2, 4, 6, 24 horas, 2 dias e 3 dias depois da injeção. Os soros foram ensaiados em um ensaio com base em ELISA planejado para detectar Flt1(1-3)-Fc. A T_{max} para todas as proteínas Flt1(1-3)-Fcs testadas foi no ponto de tempo de 6 horas mas a C_{max} foi como segue: Flt1(1-3)-Fc não modificada: 0,06 µg/ml; amostra em excesso de 10 vezes: - 0,7 µg/ml, amostra em excesso de 20 vezes - 2 µg/ml, amostra em excesso de 40 vezes - 4 µg/ml, amostra em excesso de 60 vezes - 2 µg/ml, amostra em excesso de 100 vezes - 1 µg/ml.

Figura de 10A a 10D. Seqüência de ácido nucléico e de aminoácido deduzida de Flt1(1-3)-Fc (SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO:2,

respectivamente).

Figura 11. Diagrama esquemático da estrutura de Flt1.

Figuras 12A e 12B. Análise de hidrofiliidade da seqüências de aminoácido do domínio 2 de Ig e do domínio 3 de Ig de Flt1.

5 Figuras de 13A a 13D. Seqüência de ácido nucléico e de aminoácido deduzida de Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc (SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO:4, respectivamente).

Figuras de 14A a 14C. Seqüência de ácido nucléico e de aminoácido deduzida de Mut1: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc (SEQ ID NO: 5 e SEQ ID
10 NO:6, respectivamente).

Figura de 15A a 15C. Seqüência de ácido nucléico e de aminoácido deduzida de Mut3: Flt1(2-3)-Fc (SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO:8, respectivamente).

Figura de 16A a 16D. Seqüência de ácido nucléico e de aminoácido deduzida de Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc (SEQ ID NO: 9 e SEQ ID
15 NO:10, respectivamente).

Figura 17. Ligação de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3)-Fc mutante de supressão de região básica, e mutante Flt1(1-3)_{R->N} em um ensaio com base em Biacore. Na sub-relação estequiométrica (0,25
20 µg/ml de Flt1(1-3)-Fc de amostras não modificadas, acetiladas ou geneticamente modificadas vs. 01. µg/ml de VEGF), não há proteína Flt1(1-3)-Fc suficiente para bloquear a ligação de VEGF ao Flt1(1-3)-Fc imobilizado na lasca de Biacore. Em 0,5 µg/ml de proteínas Flt1(1-3)-Fcs não modificadas, acetiladas ou geneticamente modificadas, a relação
25 estequiométrica aproxima-se de 1:1 e existe uma capacidade aumentada para bloquear a ligação de VEGF à lasca de Biacore. Em 1,0 ug/ml de proteínas Flt1(1-3)-Fcs não modificadas, acetiladas ou geneticamente modificadas, que é uma relação estequiométrica de aproximadamente 10:1, as proteínas Flt1(1-3)-Fcs são capazes de bloquear a ligação de VEGF à lasca de Biacore, mas
30 não são equivalentes. As Flt1(1-3_{oB})-Fc não modificadas, acetiladas e Mut1: são essencialmente iguais na sua capacidade para bloquear a ligação de VEGF, ao passo que a Flt1(1-3_{R->N})-Fc Mut4: é um tanto menos eficiente em

bloquear ligação.

Figura 18. Ligação de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas, Flt1(1-3_{ΔB})-Fc Mut1:, Flt1(2-3_{ΔB})-Fc Mut2: e mutante Flt1(2-3) às placas revestidas com Matrigel®. A proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada liga-se avidamente a estes reservatórios, a proteína Mut3: Flt1(2-3)-Fc liga-se um tanto mais fracamente, a proteína Flt1(1-3_{ΔB})-Fc Mut1: liga-se mais fracamente ainda, e a proteína Flt1(2-3eB)-Fc Mut2: mostra o melhor perfil, a ligação mais fraca do que qualquer uma das outras proteínas mutantes. A proteína mutante de glicosilação Flt1(1-3_{R->N})-Fc Mut4: apresenta apenas benefício marginal no ensaio de Matrigel.

Figura 19. Ligação de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas, Flt1(1-3_{ΔB})-Fc Mut1:, Flt1(2-3_{ΔB})-Fc Mut2:, e mutante Flt1(2-3) em um ensaio com base em ELISA. Nas concentrações testadas, as proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3_{ΔB})-Fc Mut1:, Flt1(2-3_{ΔB})-Fc Mut2:, e mutante Flt1(2-3) ligam-se similarmente ao VEGF.

Figura 20. Perfis farmacocinéticos de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, Flt1(2-3_{ΔB})-Fc Mut2: e mutante Flt1(2-3). A C_{max} para estes reagentes foi como segue: Flt1(1-3)-Fc não modificada - 0,15 µg/ml; Flt1(1-3)-Fc acetilado com excesso molar de 40 vezes - 1,5 µg/ml; e Flt1(1-3_{ΔB})-Fc Mut1:- 0,71 µg/ml.

Figuras 21A a 21C. Seqüência de nucleotídeo e de aminoácido deduzida do receptor Flt1 modificado denominada Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO:12, respectivamente).

Figuras 22A a 22C. Seqüência de ácido nucléico e de aminoácido deduzida do receptor Flt1 modificado denominada Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) (SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO:14, respectivamente).

Figura 23. Ensaio de matriz extracelular (ECM). Os resultados deste ensaio demonstram que as proteínas Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) são consideravelmente menos grudentas ao ECM quando comparadas à proteína Flt1(1-3)-Fc.

Figuras de 24A a 24C. Seqüência de ácido nucléico e de

aminoácido deduzida do receptor Flt1 modificado denominado VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) (SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO:16, respectivamente).

Figuras 25A a 25C. Ensaio de fosforilação. Em um excesso molar de 1,5 de Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40) ou Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) transitória existe bloqueio completo do estímulo de receptor por estes três receptores Flt1 modificados quando comparado à inoculação do meio de controle. Ao contrário, a Flt1D2VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) transitória não apresenta bloqueio significativo neste excesso molar, quando comparado com a inoculação de controle positivo em VEGF. Resultados similares são observados na Figura 25B, onde os receptores Flt modificados estão em um excesso molar de 3 vezes em relação ao ligante VEGF165. Na Figura 25C, onde os receptores Flt1 modificados estão em um excesso molar de 6 vezes em relação ao ligante VEGF165, a Flt1D2VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) transitória pode ser agora mostrada bloquear parcialmente o estímulo induzido pelo VEGF165 de receptores de superfície celular.

Figuras 26A e 26B. Ensaio de fosforilação. Detecção pela *Western blot* de VEGFR2(Flk1) fosforilada com tirosina pelo estímulo do ligante VEGF165 mostra que os receptores de superfície celular não são fosforilados pelas amostras inoculadas que têm VEGF165 pré incubadas com excesso molar de 1 e 2 vezes (Figura 26A) ou excesso molar de 3 e 4 vezes (Figura 26B) de Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) transitória, Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) estável ou VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) transitória. Em todas as concentrações receptor de Flt1 modificado testados houve ligação completa do ligante VEGF165 durante a pré incubação, resultando em nenhum estímulo detectável de receptores de superfície celular pelo VEGF165 não ligado quando comparado à inoculação do meio de controle.

Figura 27. Ensaio de proliferação de célula MG/R2. Os seguintes receptores Flt modificados Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.FlklD3.Fc Δ C1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a), mais um receptor irrelevante denominado Tie2-Fc como um controle negativo, foram titulados de 40nM a 20pM e

incubados nas células durante 1 hora a 37° C. O VEGF165 recombinante humano em meio definido foi depois adicionado a todos os reservatórios a uma concentração de 1,56 nM. O receptor Tie2-Fc de controle negativo não bloqueia a proliferação de célula induzida pelo VEGF165 em nenhuma
 5 concentração ao passo que a Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) bloqueia o VEGF165 a 1,56 nM com uma meia dose máxima de 0,8 nM. A Flt1(1-3)Fc e a Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) são menos eficazes em bloquear o VEGF165 neste ensaio com uma meia dose máxima de - 2 nM. O VEGF165 sozinho dá uma leitura de 1,2 unidades de absorbância e o fundo é 0,38 unidades de
 10 absorbância.

Figura 28. Análise de Biacore de Estequiometria de Ligação. A estequiometria de ligação foi calculada como uma relação molar de VEGF165 ligado à Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ou VEGFR1R2-FcΔC1(a) imobilizadas, usando-se o fator de conversão de 1000 RU equivalente a 1
 15 ng/ml. Os resultados indicam a estequiometria de ligação de uma molécula dimérica de VEGF165 por uma molécula de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ou de VEGFR1R2-FcΔC1(a).

Figura 29 e Figura 30. Estequiometria Cromatográfica de Exclusão de Tamanho. Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ou VEGFR1R2-FcΔC1(a) em uma concentração de 1 nM (estimado ser 1000 vezes maior do que o KD da Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ou interação VEGFR1R2-FcΔC1(a)/VEGF165) foram misturados com concentrações variadas de VEGF165. Depois da incubação, as concentrações da Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) em solução foram medidas. Os dados mostram que a adição de VEGF165 1 nM na solução de
 20 Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) bloqueia completamente a ligação de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) à superfície de VEGF165. Este resultado sugere que a estequiometria de ligação de uma molécula de VEGF165 por molécula de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a).

Figura 31. Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) sob
 30 condições nativas. O Pico #1 representa o complexo

Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/ VEGF165 e o Pico #2 representa VEGF165 não ligado. As frações eluídas entre 1,1 e 1,2 ml foram combinadas e cloridreto de guanidínio (GuHCl) foi adicionado a uma concentração final de 4,5 M para dissociar o complexo.

5 Figura 32. Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) sob condições dissociativas. Para separar os componentes do complexo receptor-ligante e para determinar a sua relação molar, 50 µl do complexo dissociado foram carregados em uma Superose 12 PC 3.2/30 equilibrada em GuHCl 6 M e eluída. O Pico #1 representa Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) e o pico #2 representa
10 a VEGF165.

Figura 33, Figura 34 e Figura 35. Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) com Dispersão de Luz Em linha. A coluna de cromatografia de exclusão de tamanho com um detetor de dispersão de luz MiniDawn em linha (Wyatt Technology, Santa Barbara, Califórnia) e
15 detetores de índice de refração (RI) (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi usado para determinar o peso molecular (o peso molecular) do complexo receptor-ligante. Como apresentado na Figura 33, o perfil de eluição apresenta dois picos. O Pico #1 representa o complexo de receptor-ligante e o pico #2 representa o VEGF165 não ligado. O peso molecular foi calculado a partir dos
20 sinais LS e RI. O mesmo procedimento foi usado para determinar o peso molecular dos componentes individuais do complexo de receptor-ligante. O resultado destas determinações são como segue: o peso molecular do complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165 na posição de pico é 157 300 (Figura 33), o peso molecular de VEGF165 na posição de pico é 44 390 (Figura 34) e o peso molecular de R1R2 no pico é 113 300 (Figura 35).
25

Figura 36. Análise de mapeamento e glicosilação de peptídeo. As estruturas de dissulfeto e os sítios de glicosilação na Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) foram determinados por um método de mapeamento de peptídeo. Existe um total de dez cisteínas na
30 Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a); seis das dez pertencem à região Fc. Cys27 é ligada

pelo dissulfeto à Cys76. A Cys121 - é ligada pelo dissulfeto à Cys182. As duas primeiras cisteínas na região Fc (Cys211 e Cys214) formam uma ligação de dissulfeto intermolecular com as mesmas duas cisteínas em uma outra cadeia Fc. Entretanto, não pode ser determinado se a ligação de dissulfeto está ocorrendo entre as mesmas cisteínas (Cys211 a Cys211, por exemplo) ou entre Cys211 e Cys214. A Cys216 é ligada pelo dissulfeto à Cys306. A Cys352 é ligada pelo dissulfeto à Cys410.

Existem cinco sítios de glicosilação ligados em N possíveis na Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e descobriu-se que são glicosilados em graus variáveis. A glicosilação completa é observada em Asn33, Asn193 e Asn282. A glicosilação parcial é observada em Asn65 e Asn120. Os sítios de glicosilação são realçados por sublinhado na Figura.

Figura 37. Farmacocinéticas de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e VEGFR1R2-FcΔC1(a). camundongos Balb/c foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1DIFcΔC1(a) transitoriamente expressada em CHO, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) estavelmente expressada em CHO e VEGFR1R2-FcΔC1(a) transitoriamente expressada em CHO. Os camundongos foram sangrados na cauda em 1, 2, 4, 6, 24 horas, 2 dias, 3 dias e 6 dias depois da injeção. Os soros foram ensaiados em um ELISA planejado para detectar Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) ou VEGFR1R2FcΔC1(a). A T_{max} para Flt1(1-3)-Fc (A40) foi em 6 horas enquanto a T_{max} para a Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) transitória e estável e a VEGFR1R2-FcΔC1(a) transitória foi de 24 horas. A C_{max} para a Flt1(1-3)-Fc (A40) foi 8 µg/ml, para ambas as transitórias (Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e VEGFR1R2-FcΔC1(a)) a C_{max} foi 18 µg/ml e a C_{max} para a VEGFR1R2-FcΔC1(a) estável foi de 30 µg/ml.

Figura 38. Farmacocinéticas de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). camundongos Balb/c foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de Flt1(1-3)-Fc (A40),

Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) transitoriamente expressadas em CHO e Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) transitoriamente expressadas em CHO. Os camundongos foram sangrados na cauda em 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 15 e 20 dias depois da injeção. Os soros foram ensaiados em um ELISA planejado para
 5 detectar Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a). Flt1(1-3)-Fc (A40) não pode ser mais detectado no soro após o dia 5 ao passo que a Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) e a Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) foram detectáveis durante 15 dias ou mais.

Figura 39. A Capacidade da Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) para
 10 Inibir o Desenvolvimento de Tumor de Fibrossarcoma HT-1080 *In Vivo*. O tratamento dia sim, dia não ou 2 vezes por semana de camundongos SCID com Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) a 25 mg/Kg diminuiu significativamente o desenvolvimento de tumores subcutâneos de fibrossarcoma HT-1080.

Figura 40. A Capacidade de Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) para
 15 Inibir o Desenvolvimento de Tumor de Glioma C6 *In Vivo*. O tratamento dia sim, dia não ou 2 vezes por semana de camundongos SCID com Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) significativamente diminui o desenvolvimento de tumores subcutâneos de glioma C6 em doses tão baixas quanto 2,5 mg/Kg.

Figura 41. Hiperpermeabilidade Uterina Induzida pelo VEGF.
 20 PMSG subcutaneamente injetados (5 IU) para induzir a ovulação em ratos fêmeas na pré puberdade resulta em um aumento súbito de estradiol depois de 2 dias que por sua vez causa uma indução de VEGF no útero. Esta indução resulta na hiperpermeabilidade do útero e um aumento na umidade uterina. A injeção subcutânea de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) e
 25 Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) a 25 mg/kg em 1 hora depois da injeção de PMSG resulta em uma inibição de aproximadamente 50 % no aumento do peso úmido uterino.

Figuras 42A e 42B. Estimativa da Angiogênese do Corpo
 Lúteo Usando-se a Progesterona como uma Leitora. PMSG foi
 30 subcutaneamente injetado (5 IU) para induzir a ovulação ratos fêmeas na pré

puberdade, resultando em um corpo lúteo totalmente em funcionamento contendo uma rede densa de vasos sangüíneos que secreta progesterona na corrente sangüínea para preparar o útero para a implantação. A indução da angiogênese no corpo lúteo requer o VEGF. Os níveis normais de progesterona são de cerca de 5 ng/ml e podem ser induzidos de 25 a 40 ng/ml depois da PMSG. A injeção subcutânea de Flt1(1-3)-Fc (A40) ou de Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) a 25 mg/kg ou 5 mg/kg em 1 hora depois da injeção de PMSG resultou em uma completa inibição da indução da progesterona no dia 4.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Tem sido um problema de longa data na técnica produzir um antagonista de VEGF com base em receptor que tivesse um perfil farmacocinético que fosse apropriado em consideração ao antagonista como um candidato terapêutico. Os requerentes descrevem aqui, pela primeira vez, uma molécula de polipeptídeo quimérica, capaz de antagonizar a atividade do VEGF, que exhibe propriedades farmacocinéticas melhoradas quando comparada a outros antagonistas de VEGF com base em receptor conhecidos. As moléculas de polipeptídeo quiméricas aqui descritas fornecem assim pela primeira vez moléculas apropriadas para o uso em terapias em que o antagonismo ao VEGF é um resultado desejado.

A presente invenção fornece as novas moléculas de polipeptídeo quiméricas formadas pela fusão de um domínio de ligação de ligante extracelular modificado do Receptor Flt1 à região Fc da IgG.

O domínio de ligação de ligante extracelular é definido como a porção de um receptor que, na sua conformação nativa na membrana celular, é orientada extracelularmente onde esta pode contatar com o seu ligante cognato. O domínio de ligação de ligante extracelular não inclui os aminoácidos hidrofóbicos associados com o domínio transmembrana do receptor ou qualquer um dos aminoácidos associados com o domínio intracelular do receptor. No geral, o domínio intracelular ou citoplásmico de

um receptor é usualmente composto de aminoácidos positivamente carregados ou polares (isto é, lisina, arginina, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico). Os 15 a 30 aminoácidos precedentes, predominantemente hidrofóbicos ou apolares (isto é, leucina, valina, isoleucina e fenilalanina) compreendem o domínio transmembrana. O domínio extracelular compreende os aminoácidos que precedem o trecho transmembrana hidrofóbico de aminoácidos. Usualmente o domínio transmembrana é flanqueado pelos aminoácidos positivamente carregados ou polares tais como lisina ou arginina. von Heijne publicou regras detalhadas que são comumente referidas pelos técnicos habilitados quando da determinação de quais dos aminoácidos de um dado receptor pertencem aos domínios extracelulares, de transmembrana ou intracelulares (Ver von Heijne, 1995, BioEssays 17: 25 a 30). Alternativamente, *websites* na Internet, tais como <http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED-form.html>, tornaram-se disponíveis para suprir os químicos de proteína com informação a cerca de prognósticos de fabricação a respeito dos domínios de proteína.

A presente invenção fornece a construção de moléculas de ácido nucléico que codificam moléculas de polipeptídeo quiméricas que são inseridas em um vetor que é capaz de expressar as moléculas de polipeptídeo quiméricas quando introduzido em uma célula hospedeira apropriada. As células hospedeiras apropriadas incluem, mas não são limitados a células bacterianas, células de leveduras, células de insetos e células mamíferas. Qualquer um dos métodos conhecidos por uma pessoa habilitada na técnica para a inserção de fragmentos de DNA em um vetor pode ser usado para construir vetores de expressão que codificam as moléculas de polipeptídeo quiméricas sob o controle de sinais de controle transcricional/translacional. Estes métodos podem incluir DNA recombinante *in vitro* e técnicas sintéticas e recombinações *in vivo* (recombinação genética) (Ver Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols em Molecular Biology, Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ.

Assoc., Wiley-Interscience, NY).

A expressão de moléculas de ácido nucléico que codificam as moléculas de polipeptídeo quiméricas podem ser reguladas por uma segunda seqüência de ácido nucléico de modo que a molécula de polipeptídeo quimérica seja expressada em um hospedeiro transformado com a molécula de DNA recombinante. Por exemplo, a expressão das moléculas de polipeptídeo quiméricas aqui descritas pode ser controlada por qualquer elemento promotor/realçador conhecido na técnica. Os promotores que podem ser usados para controlar a expressão das moléculas de polipeptídeo quiméricas incluem, mas não são limitados à repetição de terminal longo como descrito em Squinto *et al.*, (1991, Cell 65: 1 a 20); à região promotora que está no início do SV40 (Bernoist e Chambon, 1981, Nature 290: 304 a 310), o promotor do CMV, a repetição do terminal 5' de M-MuLV, o promotor contido na repetição do terminal longo 3' do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, Cell 22: 787 a 797), o promotor da timidina quinase do herpes (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 144 a 1445), as seqüências reguladoras do gene da metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, Nature 296: 39 a 42); vetores de expressão procarióticos tais como o promotor da O-lactamase (Villa-Kamaroff, *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727 a 3731), ou o promotor *tac* (DeBoer, *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21 a 25, ver também "Useful proteins from recombinant bacteria" na Scientific American, 1980, 242: 74 a 94); elementos promotores da levedura ou outros fungos tais como o promotor Gal 4, o promotor ADH (álcool desidrogenase), promotor PGK (fosfoglicerol quinase), promotor da alcalino fosfatase, e as seguintes regiões de controle transcricional animal, que exibem especificidade de tecido e foram utilizadas em animais transgênicos: a região de controle do gene da elastase I que é ativo nas células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, Cell 38: 639 a 646; Ornitz *et al.*, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399 a 409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425 a 515); região de controle do gene da insulina que é

ativa nas células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315: 115 a 122), região de controle do gene da imunoglobulina que é ativa em células linfóides (Grosschedl *et al.*, 1984, Cell 38: 647 a 658; Adames *et al.*, 1985, Nature 318: 533 a 538; Alexander *et al.*, 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436 a 1444), região de controle do vírus do tumor mamário de que é ativa em células testiculares, da mama, linfóides e mastóides (Leder *et al.*, 1986, Cell 45: 485 a 495), região de controle do gene da albumina que é ativa no fígado (Pinkert *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1: 268 a 276), região de controle do gene alfa-fetoproteína que é ativa no fígado (Krumlauf *et al.*, 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639 a 1648; Hammer *et al.*, 1987, Science 235: 53 a 58); região de controle do gene da 1-antitripsina alfa que é ativa no fígado (Kelsey *et al.*, 1987, Genes and Devel. 1: 161 a 171), região de controle do gene da beta-globina que é ativa em células mielóides (Mogam *et al.*, 1985, Nature 315: 338 a 340; Kollias *et al.*, 1986, Cell 46: 89 a 94); região de controle do gene da proteína de mielina básica que é ativa em células de oligodendrócito no cérebro (Readhead *et al.*, 1987, Cell 48: 703 a 712); região de controle do gene da cadeia leve 2 de miosina que é ativa no músculo do esqueleto (Shani, 1985, Nature 314: 283 a 286), e a região de controle do gene do hormônio de liberação gonadotrópico que é ativa no hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, Science 234: 1372 a 1378).

Assim, de acordo com a invenção, os vetores de expressão capazes de serem replicados em um hospedeiro bacteriano ou eucariótico que compreendo ácido nucléico que codifica a molécula de polipeptídeo quimérica como aqui descrito, são usados para transfectar o hospedeiro e por meio deste a expressão direta de tais ácidos nucléicos para produzir as moléculas de polipeptídeo quiméricas, que podem ser depois recuperadas em uma forma biologicamente ativa. Como aqui usado, uma forma biologicamente ativa inclui uma forma capaz de ligação ao VEGF.

Os vetores de expressão contendo as moléculas quiméricas de ácido nucléico aqui descritos podem ser identificados por três métodos gerais:

(a) hibridização DNA-DNA, (b) presença ou ausência de funções de gene

“marcador”, e (c) expressão de seqüências inseridas. No primeiro método, a presença de um gene estranho inserido em um vetor de expressão pode ser detectada pela hibridização de DNA-DNA usando-se sondas que compreendam seqüências que são homólogas às seqüências molécula de polipeptídeo quimérica inseridas. No segundo método, o sistema recombinante de vetor/hospedeiro pode ser identificado e selecionado com base na presença ou ausência de certas funções de gene “marcador” (por exemplo, atividade de timidina quinase, resistência a antibióticos, fenótipo de transformação, formação de corpo de oclusão em baculovírus, etc.) causadas pela inserção de gene estranhos no vetor. Por exemplo, se a seqüência de DNA da molécula de polipeptídeo quimérica é inserida dentro da seqüência de gene marcador do vetor, recombinantes contendo o inserto podem ser identificados pela ausência da função de gene marcador. No terceiro método, os vetores de expressão recombinantes podem ser identificados ensaiando-se o produto do gene estranho expressado pelo recombinante. Tais ensaios pode ser baseados, por exemplo, nas propriedades físicas ou funcionais das moléculas de polipeptídeo quiméricas.

As células da presente invenção podem expressar transitoriamente ou, preferivelmente, constitutiva e permanentemente as moléculas de polipeptídeo quiméricas.

As moléculas de polipeptídeo quiméricas podem ser purificadas por qualquer técnica que permita a formação subsequente de uma molécula de polipeptídeo quimérica estável, biologicamente ativa. Por exemplo, e não por via de limitação, os fatores podem ser recuperados das células como proteínas solúveis ou como corpos de inclusão, das quais podem ser extraídos quantitativamente pelo cloridreto de guanidínio 8 M e diálise (ver, por exemplo, Builder, *et al.*, Patente US Nº 5.663.304). De modo a purificar mais os fatores, a cromatografia de troca de íon convencional, a cromatografia de interação de hidrofóbicos, a cromatografia de fase reversa ou filtração em gel podem ser usados.

Em uma forma de realização da invenção, a seqüência de nucleotídeo que codifica o primeiro componente está a montante da seqüência de nucleotídeo que codifica o segundo componente. Em uma outra forma de realização preferida da invenção, a seqüência de nucleotídeo que codifica o primeiro componente está a jusante da seqüência de nucleotídeo que codifica o segundo componente. Outras formas de realização da invenção podem ser preparadas em que a ordem do primeiro, segundo e terceiro componentes de polipeptídeo de fusão são rearranjados. Por exemplo, se a seqüência de nucleotídeo que codifica o primeiro componente é designada 1, a seqüência de nucleotídeo que codifica o segundo componente é designada 2 e a seqüência de nucleotídeo do terceiro componente é designada 3, então a ordem dos componentes no ácido nucléico isolado da invenção como lido a partir de 5' para 3' pode ser qualquer uma das seis combinações seguintes: 1,2,3; 1,3,2; 2,1,3; 2,3,1; 3,1,2; ou 3,2,1.

A presente invenção também tem utilidades de diagnóstico e terapêutica. Em particular, as formas de realização da invenção, os métodos de detectar aberrações na função ou expressão das moléculas de polipeptídeo quiméricas aqui descritas podem ser usados no diagnóstico de distúrbios. Em outras formas de realização, a manipulação das moléculas de polipeptídeo quiméricas ou de agonistas ou antagonistas que ligam as moléculas de polipeptídeo quiméricas podem ser usados no tratamento de doenças. Em outras formas de realização, a molécula de polipeptídeo quimérica é utilizada como um agente para bloquear a ligação de um agente de ligação ao seu alvo.

Por via de exemplo, mas não de limitação, o método da invenção pode ser útil no tratamento de condições clínicas que são caracterizadas pela permeabilidade vascular, edema ou inflamação tal como edema cerebral associado com dano, acidente vascular cerebral ou tumor; edema associado com distúrbios inflamatórios tal como psoríase ou artrite, incluindo a artrite reumatóide; asma; edema generalizado associado com queimaduras; ascites e efusão pleural associadas com tumores, inflamação ou

trauma; inflamação crônica das vias aéreas; síndrome do vazamento capilar; sépse; doença renal associadas com o vazamento aumentado de proteína; e distúrbios oculares tais como degeneração macular relacionada com a idade e retinopatia diabética.

5 Uma análise da sequência de aminoácido de Flt1(1-3)-Fc revelou a presença de um número inusitadamente alto (46) do resíduo aminoácido básico de lisina. Uma análise IEF de Flt1(1-3)-Fc mostrou que esta proteína tem pI maior do que 9,3, confirmando o prognóstico de que a proteína é muito básica. Levantou-se a hipótese de que a natureza básica da
10 proteína Flt1(1-3)-Fc fosse a causa da sua ligação aos componentes da matriz extracelular e que esta interação poderia ser a causa da meia vida extremamente curta detectável no soro circulante exibido pela Flt1(1-3)-Fc quando injetada em camundongos. A fim de testar esta hipótese, a proteína Flt1(1-3)-Fc foi acetilada nos resíduos de lisina para reduzir a carga básica. A
15 Flt1(1-3)-Fc acetilada foi depois testada nos ensaios descritos abaixo.

Os seguintes exemplos são oferecidos por via de ilustração e não por via de limitação.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Expressão da proteína Flt1(1-3)-Fc em células CHO K1.

20 Usando-se técnicas padrão da biologia molecular (ver por exemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY), o gene que codifica a Flt1(13)-Fc foi inserido no vetor de expressão pEE14.1 (Lonza
25 Biologics, plc) em um sítio de clonagem múltipla a jusante do promotor CMV. As células CHO K1 foram transfectadas com a construção de DNA de pEE14.1/Flt1(1-3)-Fc usando-se lipofectamina (Gaithersburg, MD). As células CHO K1 transfectadas foram cultivadas em DMEM isento de glutamina (JRH, Kansas City, MO) contendo 25 µM de metionina
30 sulfoximina (MSX) da Sigma Inc., St. Louis, MO, e os expressores da

proteína altamente recombinantes foram obtidos pela avaliação dos sobrenadantes de célula CHO K1 de mais de 100 colônias isoladas coletadas a mão usando-se um imunoensaio padrão que captura e detecta Fc humano. O clone coletado a mão selecionado foi amplificado na presença de 100 μ M de MSX seguido por uma segunda rodada de avaliação dos clones amplificados. O clone de produção mais alta teve uma produtividade específica da proteína recombinante Flt1(1-3)-Fc de 55 pg/célula/dia.

O clone selecionado foi expandido em frascos T de 225 cm² (Corning, Acton, MA) e depois em garrafas de rolagem de 8,5 litros (Corning, Acton, MA) usando-se o meio de cultura de célula descrito acima. As células foram removidas das garrafas de rolagem pela tripsinização padrão e colocadas em 3,5 litros de meio de suspensão. O meio de suspensão é compreendido de meio ISCHO isento de glutamina (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contendo 5 % soro fetal bovino (FBS da Hyclone Labs, Logan, UT), 100 μ M de suplemento MSX e GS (JRH Scientific, Kansas City, MO) em um biorreator Celligen de 5 litros (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ) a uma densidade de $0,3 \times 10^6$ células/ml. Depois que as células atingiram uma densidade de $3,6 \times 10^6$ /ml e foram adaptadas para suspensão foram transferidas para um biorreator de 60 litros (ABEL, Allentown, PA) a uma densidade de $0,5 \times 10^6$ células/ml em 20 litros de meio ISCHO com 5 % de soro fetal bovino. Depois de dois dias um adicional de 20 litros de ISCHO + 5 % de soro fetal bovino foi adicionado ao biorreator. As células foram deixadas crescer por mais dois dias atingindo uma densidade final de $3,1 \times 10^6$ células/ml e uma concentração final de Flt1(1-3)-Fc na colheita foi de 95 mg/litro. Na colheita as células foram removidas por filtração de fluxo tangencial usando-se Filtros Prostack de 0,45 μ m (Millipore, Inc., Bedford, MA).

Exemplo 2: Purificação de proteína Flt1(1-3)-Fc obtida das células CHO K1

A proteína Flt1(1-3)-Fc foi inicialmente purificada pela

cromatografia de afinidade. Uma coluna de Proteína A foi usada para ligar, com alta especificidade, a porção Fc da molécula. Esta proteína purificada por afinidade foi depois concentrada e passada em uma coluna SEC. A proteína foi depois eluída no tampão de formulação. O seguinte descreve estes procedimentos em detalhes.

Materiais e Métodos

Todos os produtos químicos foram obtidos da J.T. Baker, Phillipsburg, NJ com a exceção do PBS; que foi obtido como um concentrado 10X da Life Technologies, Gaithersburg, MD. As resinas Protein A Fast Flow e Superdex 200 grau de preparação foram obtidas da Pharmacia, Piscataway, NJ. O equipamento e as membranas para a concentração da proteína foram obtidos da Millipore, Bedford, MA.

Aproximadamente 40 litros de meio condicionado de CHO filtrado em 0,45 μm contendo a proteína Flt1(1-3)-Fc foi aplicado a uma coluna de Protein A Fast Flow de 290 ml (10 cm de diâmetro) que foi equilibrada com PBS. A coluna foi lavada com PBS contendo 350 mM de NaCl e 0,02 % de CHAPS e a proteína ligada foi eluída com 20 mM de Ácido Cítrico contendo 10 mM de Na_2HPO_4 . O único pico na eluição foi coletado e o seu pH foi elevado até a neutralidade com NaOH 1 M. As frações eluídas foram concentradas até aproximadamente 9 mg/ml usando membranas de celulose 10K regeneradas tanto por filtração de fluxo tangencial quanto por concentração de célula agitada. Para remover agregados e outros contaminantes, a proteína concentrada foi aplicada a uma coluna empacotada com resina Superdex 200 grau de preparação (10 cm x 55 cm) e conduzida em PBS contendo 5 % de glicerol. As frações de pico principal foram reunidas, filtradas estéreis, aliquotadas e armazenadas a -80°C .

Exemplo 3: Acetilação da proteína Flt1(1-3)-Fc.

Duas miligramas da proteína Flt1(1-3)-Fc foram acetiladas como descrito no manual de instrução fornecido com o conjunto de modificação sulfo-NHS-acetato (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, Cat.

#26777).

Exemplo 4: Caracterização da proteína Flt1(1-3)-Fc acetilada.

(a.) Análise IEF: A Flt1(1-3)-Fc e a Flt1(1-3)-Fc acetilada foram analisadas pela análise IEF padrão. Como mostrado na Figura 1, a proteína Flt1(1-3)-Fc não é capaz de migrar no gel e portanto deve ter um pI maior do que 9,3, o pI mais alto no padrão. Entretanto, a Flt1(1-3)-Fc acetilada é capaz de migrar no gel e equilibrar em um pI de aproximadamente 5,2. Este resultado demonstra que a acetilação reduz a carga líquida positiva da proteína e portanto consideravelmente o seu pI.

(b.) Ligação aos componentes da matriz extracelular

Para testar quanto a ligação aos componentes da matriz extracelular, a Flt1(1-3)-Fc e a Flt1(1-3)-Fc acetilada foram testadas em um ensaio planejado para imitar a interação com os componentes da matriz extracelular. Neste ensaio, placas de cultura de tecido de 96 reservatórios são revestidas com Matrigel (placa de 96 reservatórios de matriz de camada fina de Biorrevestimento MATRIGEL®, Catálogo #40607, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). As placas são incubadas com concentrações variáveis de proteína Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc acetilada ou rTie2-Fc (um controle irrelevante) são adicionadas aos reservatórios. As placas são incubadas durante 1 a 2 horas na temperatura ambiente ou a 37° C graus e depois a detecção das proteínas ligadas é realizada pela adição de um anticorpo secundário de Fc anti-humano conjugado com fosfatase alcalina aos reservatórios. Finalmente, substrato de fosfatase alcalina é adicionado aos reservatórios e a densidade ótica é medida. A Figura 2 mostra o resultado deste ensaio. Como a proteína de controle irrelevante rTie2-Fc, a Flt1(1-3)-Fc acetilada não exhibe qualquer ligação à placa revestida com Matrigel, ao passo que a proteína Flt1(1-3)-Fc não acetilada exhibe ligação significativa. Este resultado indica que a acetilação de resíduos de aminoácido básico é um modo eficaz para interferir com as interações de carga que existem entre as proteínas positivamente carregadas e os componentes negativamente

carregados da matriz extracelular sendo estes evidenciados *in vivo*.

Exemplo 5: Polietileno glicolização da proteína Flt1(1-3)-Fc.

Embora a polietileno glicolização (polietileno glicol - PEG) de proteínas foi mostrada aumentar a sua potência *in vivo* pelo realce da estabilidade e da biodisponibilidade enquanto minimiza a imunogenicidade (ver as referências acima citadas), é contra-intuitivo que as moléculas polietileno glicoladas que são muito grandes para serem filtradas pelos glomérulos renais possam melhorar as suas propriedades farmacocinéticas. Sem estar ligado pela teoria, os Requerentes postularam que a polietileno glicolização das moléculas Flt1(1-3)-Fc pudessem melhorar as propriedades farmacocinéticas, possivelmente não pela alteração da carga positiva ou pela diminuição do pI da Flt1(1-3)-Fc, mas ao invés pela proteção física das cargas positivas da interação com a matriz extracelular. Os Requerentes decidiram tentar melhorar as propriedades farmacocinéticas das moléculas Flt1(1-3)-Fc pela incorporação de filamentos de PEGs de 20K como descrito abaixo.

Materiais e Métodos

Flt1(1-3)-Fc purificada derivada de células CHO (ver acima) foi usada nos experimentos de polietileno glicolização seguintes. PEGs funcionalizados foram obtidos da Shearwater Polymers, Huntsville, AL; Bicine da Sigma, St. Louis, MO; coluna Superose 6 da Pharmacia, Piscataway, NJ; PBS como um concentrado 10X da Life Technologies, Gaitersburg, MD; Glicerol da J. T. Baker, Phillipsburg, NJ; e géis pré moldados Bis-Tris da Novex, CA.

Filamentos de PEG 20K funcionalizados com porções de terminal específicos de amina foram usados em estudos de reação de pequena escala que foram ajustados para avaliar diferentes condições de reação em que a estequiometria de PEG:proteína foi variada. Com base nestas reações e nas análises de amostras em SDS-PAGE padrão, a Flt1(1-3)-Fc em uma concentração de 1,5 mg/ml foi reagida no pH 8,1 com moléculas de SPA-PEG 20K (propionato de succinimidila de PEG) em uma relação molar de

monômero de PEG para Flt1(1-3)-Fc de 1:6. A reação foi deixada processar a 8° C durante a noite. Para a purificação inicial, os produtos de reação foram aplicados a uma coluna Superose 6 de 10 mm x 30 cm equilibrada com PBS contendo 5 % de Glicerol. A coluna mostrou separar as moléculas Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizadas com base no grau de polietileno glicolização. As frações correspondentes que pareceram ser Flt1(1-3)-Fc dimérica primariamente mono-polietileno glicolizada e di-polietileno glicolizada, como julgado pelos padrões de faixa nos géis de SDS-PAGE redutores e não redutores foram reunidas. A concentração de proteína foi determinada medindo-se a absorbância a 280 nm. A proteína Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada foi filtrada estéril, aliquoteada e armazenada a -40° C.

Exemplo 6: Ligação de Flt1(1-3)-Fc não modificada, acetilada e polietileno glicolizada em um ensaio com base em Biacore.

As proteínas Flt1(1-3)-Fcs não modificadas, acetiladas e polietileno glicolizadas foram testadas em um ensaio com base em Biacore para avaliar a sua capacidade para ligar ao ligante de Flt1, VEGF. Neste ensaio, a proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada foi imobilizada na superfície de uma lasca de Biacore (ver Biacore Instruction Manual, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, quanto aos procedimentos padrão) e uma amostra contendo 0,2 µg/ml de VEGF e Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3)-Fc acetilada ou Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada (cada uma a 25 µg/ml) foi passada sobre as lascas revestidas com Flt1(1-3)-Fc. Para minimizar os efeitos de ligação não específica, as amostras ligadas foram lavadas com uma lavagem de 0,5 M NaCl. Em uma amostra, a Flt1(1-3)-Fc não modificada foi misturada com heparina. A heparina é uma molécula negativamente carregada e a proteína Flt1(1-3)-Fc é uma molécula positivamente carregada, de modo que quando as duas moléculas são misturadas juntas, devem interagir através das suas respectivas cargas. Isto essencialmente neutraliza a carga inerentemente positiva da Flt1(1-3)-Fc fazendo com que a molécula se comporte como se fosse quimicamente ou geneticamente modificada de modo a reduzir a sua

carga e a sua tendência para ligar por intermédio das interações de carga. Como mostrado na Figura 3, a Flt1(1-3)-Fc acetilada (colunas 13 a 16), polietileno glicolizada (colunas 17 a 20), e tratada com heparina (colunas 21 a 24) são cada uma capazes de competir completamente com a Flt1(1-3)-Fc ligada a lasca de Biacore quanto a ligação VEGF quando comparado ao controle (colunas 1 a 4) e à proteína irrelevante (colunas 5 a 8). A Flt1(1-3)-Fc não modificada (colunas 5 a 6) pareceu competir apenas parcialmente com a Flt1(1-3)-Fc ligada à lasca Biacore quanto a ligação de VEGF. Entretanto, a lavagem das amostras ligadas com NaCl 0,5 M (colunas 7 a 8) resultou em um perfil de ligação similar ao das formas modificadas de Flt1(1-3)-Fc, indicando que a proteína não modificada exibiu ligação não específica para a lasca que pode ser eliminada pela lavagem salina.

Exemplo 7: Ligação de Flt1(1-3)-Fc não modificada, acetilada e polietileno glicolada em um ensaio com base em ELISA

Proteínas Flt1(1-3)-Fcs não modificadas, acetiladas e polietileno glicolizadas foram testadas em um ensaio com base em ELISA padrão para avaliar a sua capacidade para ligar ao receptor ligante de Flt1 do VEGF. Como mostrado na Figura 4, tanto as proteínas quanto a Flt1(1-3)-Fc acetilada são capazes de ligação ao VEGF, demonstrando que modificar a proteína pela polietileno glicolização ou acetilação não destrói a sua capacidade para ligar o seu ligante.

Exemplo 8: Análises farmacocinéticas de Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3)-Fc acetilada e Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada.

Experimentos *in vivo* foram planejados para avaliar os perfis farmacocinéticos das proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas, das Flt1(1-3)-Fc acetiladas e das Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizadas. Camundongos Balb/c (23 a 28 g; 3 camundongos/grupo) foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de Flt1(1-3)-Fc não modificada, acetilada ou polietileno glicolizada. Os camundongos foram sangrados na cauda em 1, 2, 4, 6, 24 horas, 2 dias e 3 dias depois da injeção de proteína. Os soros foram ensaiados em um ensaio

com base em ELISA padrão planejado para detectar proteína Flt1(1-3)Fc. Em resumo, o ensaio envolve revestir uma placa de ELISA com VEGF, a ligação dos soros contendo Flt1(1-3)-Fc não modificada, acetilada ou polietileno glicolizada, e reportando com um anticorpo anti-Fc ligado à fosfatase alcalina.

- 5 Como mostrado na Figura 5, a $T_{\max}$ para todas as proteína Flt1(1-3)-Fcs foi entre os pontos de tempo de 6 horas e 24 horas. A $C_{\max}$ para as proteínas diferentes foi como segue: Não modificada: 0,06 $\mu\text{g/ml}$ a 0,15 $\mu\text{g/ml}$; acetilada: 1,5 $\mu\text{g/ml}$ a 4,0 $\mu\text{g/ml}$; e polietileno glicolizada: aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$.

Exemplo 9: Acetilação de Flt1(1-3)-Fc por etapas

- 10 Para determinar que a quantidade mínima de acetilação é necessária para eliminar a ligação aos componentes da matriz extracelular, um experimento foi planejado que acetilou a proteína Flt1(1-3)-Fc em um maneira por etapas usando-se quantidades crescentes em excesso molar de reagente de acetilação na mistura de reação de acetilação. A faixa de excesso
- 15 molar foi como segue: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 , 90; e 100 moles de reagente de acetilação por 1 mol de monômero de Flt1(1-3)-Fc. As reações foram realizadas como detalhado no manual de instrução fornecido com o conjunto de modificação de sulfo-NHS-Acetato (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, Cat.# 26777).

20 Exemplo 10: Caracterização da Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapas.

- (a.) Análise IEF. Proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificada e Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa foram analisadas pela análise IEF padrão. Como mostrado nas Figuras 6A e 6B, a proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada não foi capaz de migrar no gel devido ao seu pI extremamente alto (maior do
- 25 que 9,3). Entretanto, a maior parte das amostras da Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa (amostras de 30 a 100 vezes de excesso molar) foram capazes de migrar no gel e equilibrar em pIs variando entre 4,55 e 8,43, dependendo do grau de acetilação da proteína. Este resultado demonstra que a acetilação pode mudar a carga positiva da proteína de uma maneira dependente da dose e que a
- 30 redução do pI pode ser controlada controlando-se o grau de acetilação.

(b.) Ligação de Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa aos componentes da matriz extracelular

Para testar quanto a ligação aos componentes da matriz extracelular, a Flt1(1-3)-Fc e a Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa foram testadas no ensaio descrito acima planejado para imitar a interação com os componentes da matriz extracelular. Concentrações variáveis de proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa (amostras de 10, 20 e 30 vezes de excesso molar), ou rTie2-Fc (um controle irrelevante) foram adicionadas aos reservatórios. As placas foram incubadas durante 1 a 2 horas na temperatura ambiente ou a 37° C e depois a detecção de proteínas ligadas foi realizada pela adição de um anticorpo secundário de Fc anti-humano conjugado com fosfatase alcalina aos reservatórios. O substrato de fosfatase alcalina foi subsequentemente adicionado aos reservatórios e a densidade óptica medida. A Figura 7 mostra o resultado deste ensaio. Como a proteína de controle irrelevante rTie2-Fc, a Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa (amostras de 20 e 30 vezes de excesso molar) não exibiram qualquer ligação significativa às placas revestidas com Matrigel, ao passo que a proteína Flt1(1-3)-Fc não acetilada exibiu ligação significativa. A ligação é saturável, indicando que a proteína Flt1(1-3)-Fc pode ser ligada a sítios específicos, ao invés de uma interação mediada por carga mais geral que poderia não ser saturável. A amostra de excesso molar de 10 vezes mostrou ligação reduzida, mas o grau de acetilação não foi suficiente para bloquear completamente a ligação aos componentes da matriz extracelular. As amostras de excesso molar de 20 vezes e superiores não demonstraram nenhuma ligação detectável, a despeito do fato de que pela análise IEF (Figura 6A e 6B) as amostras de excesso molar inferior ainda tiveram uma carga positiva líquida grande. Este resultado demonstra que não é necessário acetilar completamente todos os aminoácidos básicos disponíveis de modo a eliminar a ligação aos componentes da matriz extracelular.

(c.) Ligação da Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa em um ensaio

com base em Biacore.

Proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas e acetiladas por etapa foram testadas em um ensaio com base em Biacore para avaliar a sua capacidade para ligar ao ligante de Flt1, VEGF. Neste ensaio, a proteína

5 Flt1(1-3)-Fc não modificada (0,5, 1,0 ou 5,0 $\mu\text{g/ml}$) foi imobilizada na superfície de uma lasca de Biacore (ver, Biacore Instruction Manual, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, quanto a procedimentos padrão) e uma solução contendo 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de VEGF e Flt1(1-3)-Fc não modificada (a 0,5, 1,0 ou 5,0 $\mu\text{g/ml}$) ou 10 amostras diferentes de Flt1(1-3)-Fc acetilada por

10 etapa (a 0,5, 1,0 ou 5,0 $\mu\text{g/ml}$ cada uma) foram passadas sobre a lasca revestida com Flt1(1-3)-Fc. Como mostrado na Figura 8, em uma relação subestequiométrica (0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Flt(1-3) não modificada ou Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa vs. 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de VEGF), não há Flt1(1-3)-Fc suficiente (seja não modificada ou acetilada por etapa) na solução para ligar

15 completamente o VEGF. A 1,0 $\mu\text{g/ml}$, que aproxima-se de uma relação estequiométrica de 1:1, tanto a Flt1(1-3)-Fc não modificada quanto a acetilada por etapa são mais capazes de competir para a ligação ao VEGF, mas ainda não há proteína Flt1(1-3)-Fc suficiente (seja não modificada ou acetilada por etapa) para ligar completamente o VEGF disponível. Entretanto, a 5,0 $\mu\text{g/ml}$,

20 que é várias vezes maior do que uma relação estequiométrica de 1:1, tanto a proteína Flt1(1-3)-Fc quanto a proteína Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa são capazes para ligar o VEGF, independente do grau de acetilação. Isto claramente demonstra que a acetilação não altera a capacidade da Flt1(1-3)-Fc para ligar VEGF.

25 (d.) Análises farmacocinéticas da Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa

Experimentos *in vivo* foram planejados para ensaiar os perfis farmacocinéticos de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas e Flt1(1-3)-Fc acetiladas por etapa. Camundongos Balb/c (23 a 28 g) foram subcutaneamente

30 injetados com 4 mg/kg de amostras não modificadas ou de excesso molar de

10, 20, 40, 60 e 100 vezes de Flt1(1-3)-Fc acetilada por etapa (3 camundongos para amostras não modificada, de excesso molar de 10, 20 e 40 vezes e 2 camundongos para amostras de excesso molar de 60 e 100 vezes). Os camundongos foram sangrados na cauda a 1, 2, 4, 6, 24 horas, 2 dias e 3 dias depois da injeção. Os soros foram ensaiados em um ensaio com base em ELISA planejado para detectar Flt1(1-3)-Fc (descrito acima). A Figura 9 detalha o resultado deste estudo. A T_{max} para todas as proteína Flt1(1-3)-Fcs testadas foi no ponto de tempo de 6 horas mas a C_{max} foi como segue: Flt1(1-3)-Fc não modificada: 0,06 µg/ml; amostra de excesso molar de 10 vezes: - 0,7 µg/ml, amostra de excesso molar de 20 vezes - 2 µg/ml, amostra de excesso molar de 40 vezes - 4 µg/ml, amostra de excesso molar de 60 vezes - 2 µg/ml, amostra de excesso molar de 100 vezes - 1 µg/ml. Este resultado demonstra que a acetilação ou polietileno glicolização de Flt1(1-3)-Fc significativamente melhora o seu perfil farmacocinético.

Exemplo 11: Construção de mutante de supressão de região básica da Flt1(1-3)-Fc designado Mut 1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc.

Com base na observação de que a Flt1(1-3)-Fc acetilada, que tem um pI abaixo de 6, tem farmacocinéticas muito melhor do que a Flt1(1-3)-Fc não modificada altamente positiva (pI > 9,3), foi indagado se a diferença nas farmacocinéticas poderiam ser atribuídas à carga líquida da proteína, que a faz grudar a componentes da matriz extracelular negativamente carregados, ou se houvesse talvez localizações específicas na superfície da proteína Flt1(1-3)-Fc que constituíssem sítios de ligação específicas para os componentes da matriz extracelular. Por exemplo, muitas proteínas são conhecidas por terem sítios de ligação de heparina, que consistem freqüentemente de um agrupamento de resíduos básicos. Algumas vezes estes resíduos são encontrados em um cacho na sequência primária da proteína; algumas das literaturas têm identificado “sequências de consenso” para tais sítios de ligação de heparina (ver por exemplo Hileman, *et al.*, 1998, Bioessays 20(2): 156 a 167). Em outros casos, a estrutura cristalina conhecida

de uma proteína revela um cacho de resíduos positivamente carregados na superfície de uma proteína, mas os resíduos vêm de regiões diferentes da sequência primária e são apenas levadas juntas quando a proteína se dobra na sua estrutura terciária. Assim é difícil deduzir se um resíduo isolado de aminoácido forma parte de um cacho de resíduos básicos na superfície da proteína. Entretanto, se existe um cacho de resíduos de aminoácido positivamente carregados na sequência primária, este não é exorbitante para supor que os resíduos estejam espacialmente próximos um dos outros e poderiam portanto ser parte de um sítio de ligação de componente de matriz extracelular. O receptor Flt1 foi estudado extensivamente e vários domínios foram descritos (ver por exemplo Tanaka *et al.*, 1997, Jpn. J. Cancer Res 88: 867 a 876). Referindo-se ao ácido nucléico e à sequência de aminoácido apresentada nas Figuras 10A a 10D (SEQ ID NO: 1 e 2, respectivamente) deste pedido, pode-se identificar a sequência de sinal para a secreção que está localizada no início da sequência e estende-se até a glicina codificada pelos nucleotídeos 76 a 78. A proteína madura começa com Ser-Lys-Leu-Lys, começado no nucleotídeo 79 da sequência de ácido nucléico. O domínio 1 de Ig da Flt1 estende-se do nucleotídeo 79 ao 393, terminando com os aminoácidos Ser-Asp-Thr. O domínio 2 de Ig da Flt1 estende-se do nucleotídeo 394 ao 687 (que codifica Gly-Arg-Pro até Asn-Thr-Ile), e o domínio 3 de Ig da Flt1 estende-se do nucleotídeo 688 até 996 (que codifica Ile-Asp-Val até Asp-Lys-Ala). Existe uma sequência de aminoácido ligada em ponte, Gly-Pro-Gly, codificada pelos nucleotídeos 997 a 1005, seguido pela sequência de nucleotídeo que codifica Fc humano (nucleotídeos de 1006 a 1701 ou aminoácidos Glu-Pro-Lys a Pro-Gly-Lys-parada).

Uma análise mais detalhada da sequência de aminoácido Flt1 revela que existe um cacho, a saber, resíduos de aminoácido 272 a 281 (KNKRASVRR) das Figuras 10A a 10D (SEQ ID NO: 2), em que 6 dos 10 resíduos de aminoácido são básicos. Esta sequência está localizada no domínio 3 da Ig de Flt1 do receptor (ver Figura 11), que não é por si só

essencial para a ligação do ligante do VEGF, mas que confere uma afinidade de ligação superior ao ligante. Um alinhamento da sequência do domínio 3 de Ig com aquela do domínio 2 de Ig revela que nesta região, existe alinhamento muito deficiente entre os dois domínios Ig, e que existem cerca de 10 aminoácidos adicionais no domínio 3 de Ig. Uma análise dos perfis de hidrofili-
5 cidade (software de computador MacVector) destes dois domínios indica claramente a presença de uma região hidrofílica na proteína (Figuras 12A a 12B). Estas observações levantaram a possibilidade de que a conformação tridimensional atual do domínio 3 da Ig de Flt1 deixaram algum
10 tipo de protrusão que não está no domínio 2 da Ig de Flt1. Para testar esta hipótese, os 10 aminoácidos adicionais foram suprimidos e a proteína resultante foi testada para ver se a supressão poderia afetar as farmacocinéticas favoravelmente sem comprometer seriamente a afinidade ao receptor para VEGF. Esta construção de DNA, que foi construída usando-se
15 as técnicas da biologia molecular padrão (ver por exemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY) no vetor de expressão pMT21 mamífero (Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA), é chamado de Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc. A construção Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc foi derivada do Flt1(1-3)-Fc pela supressão dos nucleotídeos 814 a 843 (apresentada nas Figuras 10A a 10D – SEQ ID NO: 1), que suprime a sequência de 10 resíduos de aminoácido altamente básicos Lys-Asn-Lys-Arg-Ala-Ser-Val-Arg-Arg-Arg do domínio 3 da Ig de Flt1.

25 A construção final de DNA foi verificada na sequência usando-se um seqüenciador de DNA ABI 373A e o Taq Dideoxi Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). A sequência de Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc é apresentada nas Figuras 13A a 13D (SEQ ID NO: 3 e 4, respectivamente).

30 **Exemplo 12: Construção de Flt1(1-3)-Fc mutante de supressão de região**

básica designada Mut: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc.

Uma segunda construção mutante de supressão, designada Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc, foi derivada da construção Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc pela supressão do domínio 1 da Ig de Flt1 codificado pelos nucleotídeos 79 a 393 (ver Figuras 10A a 10D – SEQ ID NO: 1); por conveniência, os nucleotídeos 73 a 78 (TCA GGT) foram mudados para TCC GGA. Isto introduziu um sítio de restrição (BspEI) sem alterar a sequência de aminoácido associada, Ser-Gly. Esta construção de DNA, que foi construída usando-se técnicas padrão de biologia molecular (ver por exemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY) no vetor de expressão mamífero pMT21 (Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA), foi também verificado na sequência usando-se um seqüenciador de DNA ABI 373A e Taq Dideoxi Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). A sequência de Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc é apresentada nas Figuras 14A a 14C (SEQ ID NO: 5).

Exemplo 13: Construção de mutante de supressão de Flt1(1-3)-Fc designada Mut3: Flt1(2-3)-Fc.

Uma terceira construção mutante de supressão, designada Mut3: Flt1(2-3)-Fc, foi construída do mesmo modo como a construção Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc, exceto que o domínio 3 da Ig de Flt1 foi deixada intacta (a região de aminoácidos básicos não foram suprimidas). A construção foi construída usando-se técnicas padrão de biologia molecular e a construção final foi verificada na sequência como descrito acima. A sequência de Mut3: Flt1(2-3)-Fc é apresentada nas Figuras 15A a 15C (SEQ ID NO: 7 e 8, respectivamente).

Exemplo 14: Construção de mutante de N-glicosilação de região básica de Flt1(1-3)-Fc designada Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc.

Uma construção final foi feita em que um sítio de N-glicosilação foi introduzido no meio da região básica do domínio 3 da Ig de

Flt1. Esta construção foi designada Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc e foi fabricada mudando-se os nucleotídeos 824 e 825 de GA para AC, mudando consequentemente o resíduo codificado Arg (AGA) em um resíduo Asn (AAC) (ver Figuras 10A a 10D - SEQ ID NO: 1 e 2, respectivamente). A seqüência de aminoácido resultante é portanto mudada de Arg-Ala-Ser para Asn-Ala-Ser, que se iguala ao sinal canônico (Asn-Xxx-Ser/Thr) para a adição de um sítio de N-glicosilação no resíduo Asn. A seqüência de Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc é apresentada nas Figuras 16A a 16D (SEQ ID NO: 9 e 10, respectivamente).

10 **Exemplo 15: Caracterização de Flt1(1-3)-Fc acetilada.**

Mutantes Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc e Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc.

(a.) Ligação aos componentes da matriz extracelular

Para determinar se as três proteínas modificadas foram mais ou menos prováveis de ter propriedades farmacocinéticas melhoradas, placas de 96 reservatórios revestidas com Matrigel (como descrito acima) foram incubadas com concentrações variáveis das proteínas mutantes e detectadas com anticorpos conjugados Fc/fosfatase alcalina anti-humano. Como mostrado na Figura 18, este experimento mostrou que embora a proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada possa ligar-se avidamente a estes reservatórios, a proteína Mut3: Flt1(2-3)-Fc liga-se um pouco mais fracamente, a proteína Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc liga-se mais fracamente ainda, e a proteína Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc mostrou o melhor perfil, ligante-se mais fracamente do que qualquer uma das outras proteínas mutantes. A proteína mutante em glicosilação Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc mostrou apenas benefício marginal no ensaio de Matrigel. Estes resultados confirmam a hipótese de que uma seqüência linear de aminoácidos positivos pode ser suprimida da seqüência primária resultando em uma diminuição na interação de carga com os componentes da matriz extracelular.

(b.) Ligação de Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc e Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc em um ensaio com base em Biacore.

Proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas e acetiladas e Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc e Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc geneticamente modificadas foram testadas em um ensaio com base em Biacore para avaliar a sua capacidade para ligar-se ao ligante Flt1, VEGF. Neste ensaio, a proteína Flt1(1-3)-Fc não modificada (0,25, 0,5, ou 1,0 µg/ml) foi imobilizada na superfície de uma lasca de Biacore (ver Biacore Instruction Manual, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ, quanto aos procedimentos padrão) e uma solução contendo 0,1 µg/ml de VEGF e sobrenadante de célula COS purificada ou contendo Flt1(1-3)-Fc não modificada (a aproximadamente (0,25, 0,5 ou 1,0 µg/ml)), Flt1(1-3)Fc acetilada, purificada (a (0,25, 0,5 ou 1,0 µg/ml), sobrenadante de célula COS contendo Mut1 Flt1(1-3_{ΔB})-Fc (a aproximadamente (0,25, 0,5 ou 1,0 µg/ml)), ou sobrenadante de célula COS contendo Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc (a aproximadamente (0,25, 0,5 ou 1,0 µg/ml) foram passadas sobre as lascas revestidas com Flt1(1-3)-Fc. Como Mostrado na Figura 17, na sub-relação estequiométrica (0,25 µg/ml Flt1(1-3)-Fc de amostras não modificadas, acetiladas ou geneticamente modificadas vs. 01. µg/ml de VEGF), a proteína Flt1(1-3)-Fc é insuficiente para bloquear a ligação de VEGF ao Flt1(1-3)-Fc imobilizado na lasca de Biacore. A 0,5 µg/ml de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificadas, acetiladas ou geneticamente modificadas, a relação estequiométrica aproxima-se de 1:1 e existe uma capacidade aumentada para bloquear a ligação de VEGF à lasca de Biacore. A 1,0 µg/ml de proteínas Flt1(1-3)-Fcs não modificadas, acetiladas ou geneticamente modificadas, que é aproximadamente uma relação estequiométrica de 10:1, as proteínas Flt1(1-3)-Fcs são capazes de bloquear a ligação de VEGF à lasca de Biacore, mas não são equivalentes. Não modificadas, acetiladas e Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc são essencialmente iguais na sua capacidade para bloquear a ligação de VEGF, ao passo que a Mut4: Flt1(1-3_{R->N})-Fc é um pouco menos eficiente no bloqueio à ligação. Este resultado confirma a hipótese de que é possível reduzir a ligação não específica de uma molécula positivamente carregada removendo-se geneticamente uma sequência linear de aminoácidos que sejam de modo

predominante negativamente carregados.

(c.) Ligação de Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc, Mut2: Flt1(2-3_{ΔB})-Fc, Mut3: Flt1(2-3)-Fc, e em um ensaio com base em ELISA.

Para determinar se as três proteínas mutantes poderiam ligar o ligante de Flt1 VEGF, experimentos de ligação foram feitos em que placas de 96 reservatórios revestidas com VEGF foram incubadas com concentrações variáveis da respectiva proteína mutante, e em seguida lavagem, a quantidade ligada foi detectada pela incubação com um anticorpo Fc anti-humano conjugado com fosfatase alcalina e quantificada colorimetricamente pela adição de um substrato apropriado de fosfatase alcalina. Como mostrado na Figura 19, este experimento mostrou que todas as proteína mutantes puderam ligar-se ao VEGF de modo similar, nas concentrações testadas.

Exemplo 16: Análises farmacocinéticas de Flt1(1-3)-Fc acetilada, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc e Flt1(1-3)-Fc não modificada.

Experimentos *in vivo* foram planejados para ensaiar os perfis farmacocinéticos de Flt1(1-3)-Fc não modificada, Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc e da proteína Flt1(1-3)-Fc acetilada em excesso molar de 40 vezes. Camundongos Balb/c (25 a 30 g) foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de proteínas Flt1(1-3)-Fc não modificada, Flt1(1-3)-Fc acetilada em excesso molar de 40 vezes e Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc (4 camundongos cada). Estes camundongos foram sangrados na cauda a 1, 2, 4, 6, 24 horas, 2 dias, 3 dias e 5 dias depois da injeção. Os soros foram ensaiados em um ELISA planejado para detectar a proteína Flt1(1-3)-Fc que envolve revestir uma placa de ELISA com VEGF, a ligação da Flt1(1-3)-Fc e reportar com um anticorpo anti-Fc ligado à fosfatase alcalina. Como mostrado na Figura 20, a C_{max} para estes reagentes foi como segue: Flt1(1-3)-Fc não modificada - 0,15 µg/ml; Flt1(1-3)-Fc acetilada em excesso molar de 40 vezes - 1,5 µg/ml; e Mut1: Flt1(1-3_{ΔB})-Fc - 0,7 µg/ml.

Exemplo 17: Construção do vetor receptor Flt1 modificado

O racional para a construção de versões modificadas do

receptor Flt1 (também conhecido como VEGFR1) foi com base na observação de que a sequência de proteína de Flt1 foi altamente básica, e foi portanto provável de grudar na matriz extracelular (ECM). A natureza altamente básica de Flt1 provavelmente explica porque a Flt1(1-3)-Fc não modificada (descrita acima) tem farmacocinéticas deficientes que a tornam difícil de usar como um agente terapêutico. Como descrito acima, a forma quimicamente modificada de Flt1(1-3)-Fc acetilada em excesso molar de 40 vezes, daqui em diante denominada A40, exibiu um perfil farmacocinético (PK) enormemente melhorado em relação à Flt1(1-3)-Fc não acetilada. Portanto, tentativas foram feitas para engendrar moléculas de DNA que pudessem ser usadas para expressar formas recombinantemente modificadas de uma molécula de receptor Flt1 que possuísse o perfil PK melhorado exibido pela A40 e ainda manter a capacidade para ligar-se firmemente ao VEGF.

É conhecido na literatura que o primeiro domínio Ig de Flt1 (que tem uma carga líquida de +5 no pH neutro) não é essencial para a ligação firme ao VEGF, assim este domínio foi suprimido. O terceiro domínio Ig (tendo uma carga líquida de +11) não é essencial para a ligação, mas confere afinidade mais alta ao VEGF do que o segundo domínio Ig, assim ao invés de suprimi-lo totalmente, este foi substituídos com os domínios equivalentes do receptor Flt1 referentes ao Flk1 (também conhecido como VEGFR2) e Flt4 (também conhecido como VEGFR3). Estas moléculas quiméricas (denotadas R1R2 (Flt1.D2.FlklD3.Fc Δ C1(a) e VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) e R1R3 (Flt1.D2.VEGFR3D3-Fc Δ C1(a) e VEGFR1R3-Fc Δ C1(a) respectivamente, em que R1 e Flt1D2 = domínio 2 da Ig de Flt1 (VEGFR1); R2 e FlklD3 = domínio 3 da Ig de Flk1 (VEGFR2); e R3 e VEGFR3D3 = domínio 3 da Ig de Flt4 (VEGFR3)) foram muito menos pegajosos ao ECM, como julgado por um ensaio *in vitro* de ligação ECM como descrito abaixo, teve PK enormemente melhorado como descrito abaixo. Além disso, estas moléculas foram capazes para ligar VEGF firmemente como descrito abaixo e bloquear

a fosforilação do receptor Flk1 nativo expressado em células endoteliais como descrito abaixo.

(a) Construção do plasmídeo de expressão
pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

5 Os plasmídeos de expressão pMT21.Flt1(1-3).Fc (6519 pares de base) e pMT21.Flk-1(1-3).Fc (5230 pares de base) são plasmídeos que codificam a resistência à ampicilina e versões alvejadas com Fc de domínios Ig 1-3 de Flt1 humano e Flk1 humano, respectivamente. Estes plasmídeos foram usados para a construção de um fragmento de DNA que consiste de
10 uma fusão do domínio 2 da Ig de Flt1 com o domínio 3 da Ig de Flk1, usando-se a amplificação por PCR dos respectivos domínios Ig seguido por outras rodadas de PCR para se obter a fusão dos dois domínios em um único fragmento. Para o domínio 2 da Ig de Flt1, os iniciadores de amplificação 5' e 3' foram como segue:

5': bsp/flt1D2

(5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3') –
SEQ ID NO: 18.

3': Flt1D2-Flk1D3.as

(5'-CGGACTCAGAACCACATCTATGATTGTATTGGT-3') - SEQ ID
NO: 19.

15 O iniciador de amplificação 5' codifica um sítio de enzima de restrição BspEI a montante do domínio 2 da Ig de Flt1, definido pela sequência de aminoácido GRPFVEM (que corresponde aos aminoácidos 27 a 33 das Figuras 21A a 21C – SEQ ID NO: 12). O iniciador 3' codifica o complemento reverso da extremidade 3' do domínio 2 da Ig de Flt1 fundida
20 diretamente no início 5' do domínio 3 da Ig de Flk1, com o ponto de fusão definido como TIID de Flt1 (que corresponde aos aminoácidos de 123 a 126 das Figuras 21A a 21C – SEQ ID NO: 12) e continuando no VVLS (que corresponde aos aminoácidos de 127 a 130 das Figuras 21A a 21C – SEQ ID NO: 12) de Flk1.

Para o domínio 3 da Ig de Flk1, os iniciadores de amplificação 5' e 3' foram como segue:

5': Flt1D2-Flk1D3.s

(5'-ACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCTCATG G-3') –
SEQ ID NO: 21.

3': Flk1D3/apa/srf.as

(5'-GATAATGCCCGGGCCCTTTTCATGGACCCTGACAAATG-3')
- SEQ ID NO: 22.

O iniciador de amplificação 5' codifica a extremidade do domínio 2 da Ig de Flt1 fundida diretamente no início do domínio 3 da Ig de Flk1, como descrito acima. O iniciador de amplificação 3' codifica a extremidade do domínio 3 da Ig de Flk1, definida pelos aminoácidos VRVHEK (que correspondem aos aminoácidos de 223 a 228 das Figuras 21A a 21C – SEQ ID NO: 12), seguido por uma sequência ligada em ponte que inclui uma sequência de reconhecimento para a enzima de restrição SrfI, e codifica os aminoácidos GPG. A sequência ligada em ponte corresponde aos aminoácidos de 229 a 231 das Figuras 21A a 21C – SEQ ID NO: 12.

Depois de uma rodada de amplificação por PCR para produzir os domínios individuais, os produtos foram combinados em um tubo e submetidos a uma outra rodada de PCR com os iniciadores bsp/flt1D2 e Flk1D3/apa/srf.as (descritos acima) para produzir o produto de fusão. Este produto de PCR foi subsequentemente digerido com as enzimas de restrição BspEI e SmaI e o fragmento resultante de 614 pares de base foi subclonado nos sítios de restrição de BspEI até SrfI do vetor pMT21/ Δ B2.Fc, para criar o plasmídeo pMT21/Flt1D2.Flk1D3.Fc. A sequência de nucleotídeo do inserto de fusão de gene Flt1D2-Flk1D3 foi verificada pela análise de sequência padrão. Este plasmídeo foi depois digerido com as enzimas de restrição EcoRI e SrfI e o fragmento resultante de 702 pares de base foi transferido nos sítios de restrição de EcoRI até SrfI do plasmídeo pFlt1(1-3)B2-Fc Δ C1(a) para produzir o plasmídeo pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a). O DNA completo e as

seqüências de aminoácido deduzidas da molécula Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) quimérica está apresentada nas Figuras 21A a 21C – SEQ ID NO: 11 e 12.

(b) Construção do plasmídeo de expressão pFlt1D2VEGFR3D3FcΔC1(a)

5 O plasmídeo de expressão pMT21.Flt1(1-3).Fc (6519 pares de base) codifica a resistência à ampicilina e uma versão alvejada em Fc de domínios de 1 a 3 da Ig de receptor Flt1 humano. Este plasmídeo foi usado para produzir um fragmento de DNA contendo o domínio 2 da Ig de Flt1 pela PCR. O RNA da linha de célula HEL921.7 foi usado para produzir o domínio 10 3 da Ig de Flk1, usando-se a metodologia padrão de RT-PCR. Uma outra rodada de amplificação por PCR foi usada para obter a fusão dos dois domínios Ig em um único fragmento fundido. Para o domínio 2 da Ig de Flt1, os iniciadores de amplificação 5' e 3' foram como segue:

5': bsp/flt1D2

(5'-GACTAGCAGTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATG-3') –
SEQ ID NO: 24.

3': Flt1D2.VEGFR3D3.as

(TTCCTGGGCAACAGCTGGATATCTATGATTGTATTGGT) - SEQ
ID NO: 25.

O iniciador de amplificação 5' codifica um sítio de restrição
15 BspEI a montante do domínio 2 da Ig de Flt1, definido pela seqüência de aminoácido GRPFVEM (que corresponde aos aminoácidos de 27 a 33 das Figuras 22A a 22C – SEQ ID NO: 14). O iniciador de amplificação 3' codifica o complemento reverso da extremidade do domínio 2 da Ig de Flt1 fundida diretamente no início do domínio 3 da Ig de VEGFR3, com o ponto
20 de fusão definido como TIID da Flt1 (que corresponde aos aminoácidos de 123 a 126 das Figuras 22A a 22C – SEQ ID NO: 14) e continuando no IQLL de VEGFR3 (que corresponde aos aminoácidos de 127 a 130 das Figuras 22A a 22C – SEQ ID NO: 14). Para o domínio 3 da Ig de VEGFR3, os iniciadores 5' e 3' usados para a RT-PCR foram como segue:

5': R3D3.s

(ATCCAGCTGTTGCCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTA) –

SEQ ID NO: 27.

3': R3D3.as

(ATTTTCATGCACAATGACCTCGGTGCTCTCCCGAAATCG) –

SEQ ID NO: 28.

Ambos os iniciadores de amplificação 5' e 3' igualam-se à sequência de VEGFR3. O produto de amplificação de 296 pares de base desta reação de RT-PCR foi isolado por técnicas padrão e submetido a uma segunda rodada de PCR para adicionar seqüências adequadas para permitir a fusão do domínio Flt1D2 com o domínio Flk1D3 e a fusão dos domínios Flk1D3 e Fc por intermédio de uma ponte GPG (ver abaixo). Os iniciadores de amplificação foram como segue:

5':Flt1D2.VEGFR3D3.s

(TCATAGATATCCAGCTGTTGCCCAGGAAGTCGCTGGAG) –

SEQ ID NO: 29.

3': VEGFR3D3/srf.as

(GATAATGCCCGGGCCATTTTCATGCACAATGACCTCGGT) –

SEQ ID NO: 30.

O iniciador de amplificação 5' codifica a extremidade 3' do domínio 2 da Ig de Flt1 fundido diretamente no início (extremidade 5') do domínio 3 da Ig de VEGFR3, como descrito acima. O iniciador de amplificação 3' codifica a extremidade 3' do domínio 3 da Ig de VEGFR3, definida pelos aminoácidos VIVHEN (que correspondem aos aminoácidos de 221 a 226 das Figuras 22A a 22C – SEQ ID NO: 14), seguido por uma sequência ligada em ponte que inclui uma sequência de reconhecimento para Srf1, e codifica os aminoácidos GPG. A sequência de ligação em ponte corresponde aos aminoácidos de 227 a 229 das Figuras 22A a 22C – SEQ ID NO: 14.

Depois de uma rodada (para o domínio 2 da Ig de Flt1) ou

duas rodadas (para o domínio 3 da Ig de Flt4) de PCR para produzir os domínios individuais de Ig, os produtos de PCR foram combinados em um tubo e submetidos a uma outra rodada de amplificação por PCR com os iniciadores de amplificação bsp/flt1D2 e VEGFR3D3/srf.as descritos acima, para produzir o produto de fusão. Este produto de PCR foi subsequentemente digerido com as enzimas de restrição BspEI e SmaI e o fragmento resultante de 625 pares de base foi subclonado nos sítios de restrição BspEI até SrfI do vetor pMT21/Flt1ΔB2.Fc (descrito acima), para criar o plasmídeo pMT21/Flt1D2.VEGFR3D3.Fc. A sequência do inserto da fusão de gene Flt1D2-VEGFR3D3 foi verificada pela análise de sequência padrão. Este plasmídeo foi depois digerido com as enzimas de restrição EcoRI e SrfI e o fragmento resultante de 693 pares de base foi subclonado nos sítios de restrição EcoRI até SrfI do plasmídeo pFlt1(1-3)ΔB2-FcΔC1(a) para produzir o plasmídeo designado pFlt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). A sequência de aminoácido completa de DNA deduzida da molécula de Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) quimérica é apresentada nas Figuras de 22A a 22C -- SEQ ID NO: 13 e 14.

Exemplo 18: Ensaio de Ligação que Liga a Matriz Extracelular (ECM)

As placas revestidas de ECM (Becton Dickinson Catálogo # 35-4607) foram reidratadas com DME quente suplementado com glutamina (2 mM), 100 U de penicilina, 100 U de estreptomicina e 10 % de BCS por pelo menos 1 hora antes de adicionar as amostras. As placas foram depois incubadas durante 1 hora na temperatura ambiente com concentrações variáveis de Flt1D2.Flt1D3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) começado em 10 nM com diluições subsequentes de 2 vezes em PBS mais 10 % de BCS. As placas foram depois lavadas 3 vezes com PBS mais 0,1 % de Triton-X e incubadas com anticorpo Fc anti-humano conjugado com fosfatase alcalina (Promega, 1:4000 em PBS mais 10 % de BCS) durante 1 hora na temperatura ambiente. As placas foram depois lavadas 4 vezes com PBS 0,1 % de Triton-X e solução tampão de fosfatase alcalina /pNPP (Sigma) foi

adicionada para o desenvolvimento de cor. As placas foram lidas a $I = 405$ a 570 nm. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 23 e demonstra que as proteínas Flt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.Fc Δ C1(a) são consideravelmente menos pegajosas à ECM quando comparadas à proteína Flt1(1-3)-Fc.

Exemplo 19: Expressão transitória de pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) em células CHO-K1 (E1A)

Uma cultura em escala grande (2 litros) de células *E. coli* DH10B que carregam o plasmídeo pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) descrito acima no Exemplo 17(a) foi cultivada durante a noite em Caldo Terrífico (TB) mais 100 μ g/ml de ampicilina. No dia seguinte, o DNA plasmídico foi extraído usando-se um conjunto QIAGEN Endofree Megaprep seguindo o protocolo da fabricante. A concentração do DNA plasmídico purificado foi determinado pelas técnicas padrão usando-se um espectrofotômetro de UV e fluorímetro. O DNA plasmídico foi verificado pela digestão padrão de enzima de restrição de alíquotas usando-se as enzimas de restrição EcoRI mais NotI e AseI. Todos os fragmentos digeridos pelas enzimas de restrição corresponderam aos tamanhos prognosticados quando analisados em um gel de agarose a 1 %.

Quarenta placas de petri 15 cm foram plaqueadas com células CHO-K1/E1A a uma densidade de 4×10^6 células/placa. O meio de plaqueamento foi Gibco Ham's F-12 suplementado com Soro fetal bovino (FBS) Hyclone a 10 %, 100 U penicilina/100 U de estreptomicina e glutamina (2 mM). No dia seguinte cada placa de células foi transfectada com 6 μ g do DNA plasmídico pFlt1D2.Flk1D3.Fc Δ C1(a) usando-se Gibco Optimem e Gibco Lipofectamina em 12 ml de volume, seguindo o protocolo do fabricante. Quatro horas depois da adição da mistura de transfecção às células, 12 ml/placa de Optimem suplementado com 10 % de FBS foi adicionado. As placas foram incubadas a 37° C em uma incubadora a 5 % de CO₂ durante a noite. No dia seguinte o meio foi removido de cada placa e 25 ml do meio de expressão (Gibco CHO-S-SFM II suplementado com glutamina (2 mM) e 1

mM de butirato de sódio) foi adicionado. As placas foram incubadas a 37° C durante 3 dias. Depois de 3 dias de incubação, o meio foi aspirado de cada placa e centrifugado a 400 rpm em um rotor de caçamba oscilante para pelotizar as células. O sobrenadante foi decantado em frascos estéreis de 1 litro e a purificação da proteína expressada foi realizada como descrito abaixo.

Exemplo 20: Construção do vetor de expressão de pVEGFR1R2-FcΔC1(a)

O plasmídeo de expressão pVEGFR1R2.FcΔC1(a) foi construído pela inserção de DNA que codifica aminoácidos SDT (que corresponde aos aminoácidos de 27 a 29 das Figuras 24A a 24C – SEQ ID NO: 16) entre aminoácidos 26 e 27 Flt1 d2-Flk1d3-FcΔC1(a) das Figuras 21A a 21C (GG) (SEQ ID NO: 12) e a remoção do DNA que codifica os aminoácidos GPG que correspondem aos aminoácidos de 229 a 231 da Figura. A sequência de aminoácido SDT é nativa ao Receptor Flt1 e foi adicionada de volta para diminuir a probabilidade de processar o N terminal heterogêneo. A GPG (sequência ligada em ponte) foi removida de modo que os domínios da Ig de Flt1 e Flk1 foram fundidos diretamente uns aos outros. As sequências de aminoácido deduzidas e do DNA completo da molécula pVEGFR1R2.FcΔC1(a) quimérica são apresentadas nas Figuras de 24A a 24C (SEQ ID NO: 15 e 16).

Exemplo 21 : Processo de Cultura de Célula Usada para Produzir Receptores Flt1 Modificados

(a) Processo de Cultura de Célula Usada para Produzir Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

O processo para a produção da proteína Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) usando-se o plasmídeo de expressão pFlt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) descrito acima no Exemplo 1 envolve a cultura em suspensão de células do ovário de hamster chinês recombinantes (CHO K1/E1A) que constitutivamente expressam o produto de proteína. As células

são cultivadas em biorreatores e o produto de proteína é isolado e purificado pela cromatografia de afinidade e de exclusão de tamanho. O processo é fornecido in maiores detalhes abaixo.

Expansão Celular

5 Dois frascos T confluentes de 225 cm² contendo a linhagem de célula que expressa Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) foram expandidos pela passagem de células em oito frascos T de 225 cm² no meio (GMEM + 10 % de soro, GIBCO) e incubados a 37° C e 5 % de CO₂. Quando os frascos aproximaram-se da confluência (aproximadamente de 3 a 4 dias) as células
10 foram destacadas usando-se tripsina. O meio fresco foi adicionado para proteger as células doutra exposição à tripsina. As células foram centrifugadas e recolocadas em suspensão em meio fresco depois transferidas a oito garrafas rolantes de 850 cm² e incubadas a 37° C e 5 % de CO₂ até confluentes.

Cultura de Suspensão em Biorreatores

15 As células cultivadas garrafas rolantes foram tripsinizadas para destaca-las da superfície e lavadas com meio de cultura de suspensão. As células são assepticamente transferidas para um biorreator de 5 litros (New Brunswick Celligen Plus) onde as células são cultivadas em 3,5 litros de cultura de suspensão. O meio de cultura de suspensão foi um modificação de
20 glicose baixa isento de glutamina de IS-CHO (Irvine Scientific) ao qual 5 % de soro fetal bovino (Hiclone), suplemento GS (Life Technologies) e 25 μM de metionina sulfoximina (Sigma) foram adicionados. O pH foi controlado a 7,2 pela adição de dióxido de carbono ao gás de entrada ou pela adição de uma solução líquida de carbonato de sódio ao biorreator. O nível de oxigênio
25 dissolvido foi mantido a 30 % de saturação pela adição de oxigênio ou nitrogênio ao gás de entrada e a temperatura controlada a 37° C. Quando uma densidade de 4 x10⁶ células/ml foi atingida as células foram transferidas para um biorreator de 40 litros contendo o mesmo meio e ajustes para controlar o biorreator. O ajuste de temperatura foi reduzido para 34° C para retardar o
30 desenvolvimento celular e aumentar a taxa relativa de expressão de proteína.

(b) Processo de Cultura de Célula Usada para Produzir Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)

As mesmas metodologias como descritas acima para Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) foram usadas para produzir Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a).

Exemplo 22: Colheita e Purificação de Receptores Flt1 Modificados

(a) Colheita e Purificação de Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

A proteína do produto foi assepticamente colhida do biorreator enquanto se retém as células usando módulos de filtração de fluxo tangencial Millipore Prostack e uma bomba mecânica de baixo cisalhamento (Fristam). O meio fresco foi adicionado ao biorreator para substituir aquele removido durante a filtração de colheita. Aproximadamente 40 litros de filtrado colhido foram depois carregados em uma coluna de 400 ml contendo a resina Protein A Sefarose (Amersham Pharmacia). Depois de carregar, a resina foi lavada com tampão contendo 10 mM de fosfato de sódio, 500 mM de cloreto de sódio, pH 7,2 para remover qualquer proteína contaminante não ligada. A proteína Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) foi eluída com um tampão de citrato no pH 3,0. A proteína eluída foi neutralizada pela adição de base de Tris e congelada a -20° C.

Diversos lotes congelados de proteína Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) da etapa de Proteína A acima foram descongelados, reunidos e concentrados usando-se uma membrana de filtração de fluxo tangencial de corte de peso molecular nominal 30kD (NMWCO) Millipore. A proteína foi transferida para um concentrador de célula agitado (Millipore) e mais concentrada a 30 mg/ml usando uma membrana NMWCO de 30kD. A proteína concentrada foi carregada em uma coluna de exclusão de tamanho empacotada com resina Superdex 200 (Amersham Pharmacia) que foi equilibrada com solução salina tamponada com fosfato mais 5 % de glicerol. O mesmo tampão foi usado para conduzir a coluna. As frações que correspondem ao dímero Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) foram reunidas, filtradas

estéril através de um filtro de 0,22 micron, aliquotadas e congeladas.

(b) Colheita e Purificação de Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)

As mesmas metodologias como descritas acima para Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) foram usados para colher e purificar a Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a).

Exemplo 23 Ensaio de Fosforilação para VEGFR2 Transitoriamente Expresso

Células endoteliais da veia umbilical humana primárias (HUVECs), inoculação de 4 a 6, foram privadas de alimento durante 2 horas em meio de glicose alta DME isento de soro. Amostras contendo 40 ng/ml (1 nM) de VEGF165 humano, que é um ligante para o receptores de VEGF Flt1, Flk1 e Flt4(VEGFR3) foram preparados e foram pré incubados durante 1 hora na temperatura ambiente com quantidades variáveis dos receptores de Flt1 modificados Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) e Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) em meio de glicose alta DME isento de soro contendo 0,1 % de BSA. As células foram inoculadas durante 5 minutos com as amostras preparadas acima +/- VEGF165, seguido pela lise de célula total usando o tampão completo de lise. Os lisados de célula foram imunoprecipitados com um anticorpo direcionado contra o término C do receptor VEGFR2. Os lisados imunoprecipitados foram carregados em 4 a 12 % de gel de SDS-PAGE Novex e depois transferidos para a membrana PVDF usando metodologias padrão de transferência. A detecção de VEGFR2 fosforilado foi feita pela imunomancha com o mAb anti-fosfo Tirosina chamado 4G10 (UBI) e reagida usando reagente ECL (Amersham).

As Figuras 25A a 25C e 26A a 26B mostram o resultado deste experimento. A Figura 25A a 25C revela que a detecção pela *Western blot* de VEGFR2(Flk1) tirosina fosforilado pela estimulação do ligante VEGF165 mostra que os receptores de superfície celular são fosforilados em níveis que variam dependendo de qual receptor Flt1 modificado é usado durante as pré incubações com VEGF. Como é observado na Figura 25A, em um excesso

molar de 1,5 de Flt1(13)-Fc , Flt1(1-3)-Fc (A40) ou Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) transitório existe o bloqueio completo do estímulo do receptor por estes três receptores Flt1 modificados quando comparado à inoculação do meio de controle. Ao contrário, o Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) transitório não apresenta bloqueio significativo neste excesso molar, quando comparado com a inoculação de VEGF de controle positivo. Resultados similares são observados na Figura 25B, onde os receptores Flt modificados estão em um excesso molar de 3 vezes em relação ao ligante VEGF165. Na Figura 25C, onde os receptores Flt1 modificados estão em um excesso molar de 6 vezes em relação ao ligante VEGF165, o Flt1D2VEGFR3D3.FcΔC1(a) transitório pode ser agora mostrado ser parcialmente bloqueador do estímulo induzido pelo VEGF165 de receptores de superfície celular.

Na Figura 26A a 26B, a detecção pela *Western blot* de VEGFR2(Flk1) fosforilado com tirosina pelo estímulo do ligante VEGF165 mostra que os receptores de superfície celular não são fosforilados pelas amostras inoculadas que têm VEGF165 pré incubados com excesso molar de 1 e 2 vezes (Figura 26A) ou excesso molar de 3 e 4 vezes (Figura 26B) de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) transitório, Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) estável ou VEGFR1R2-FcΔC1(a) transitório. Em todas as concentrações de receptores Flt1 modificados testadas houve a ligação completa de ligante VEGF165 durante a pré incubação, não resultando em nenhum estímulo detectável de receptores de superfície celular pelo VEGF165 não ligado quando comparado à inoculação de meio de controle.

Exemplo 24: Bioensaio de Proliferação de Célula

A população de célula de teste é de células MG87 que foram estavelmente transfectadas com um plasmídeo de expressão que contém um inserto de DNA que codifica o domínio extracelular de VEGFR2(Flk1) fundido ao domínio TrkB de quinase intracelular, produzindo assim uma molécula quimérica. A razão do domínio TrkB de quinase intracelular ter sido usado ao invés do domínio VEGFR2(Flk1) de quinase intracelular nativo é

que o domínio de quinase intracelular de VEGFR2(Flk1) não causa uma resposta proliferativa forte quando estimulada pelo VEGF165 nestas células. É conhecido que as células MG87 contendo o receptor TrkB de comprimento completo dão uma resposta proliferativa robusta quando estimulada com BDNF, de modo que o domínio TrkB de quinase intracelular foi engendrado para substituir o domínio de quinase intracelular de VEGFR2(Flk1) para se levar vantagem desta capacidade de resposta proliferativa.

5×10^3 células/reservatório foram plaqueadas em uma placa de 96 reservatórios e deixadas sedimentar durante 2 horas a 37° C. Os seguintes receptores Flt modificados Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.FlklD3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a), mais um receptor irrelevante denominado Tie2-Fc como um controle negativo, foram titulados de 40 nM a 20 pM e incubados nas células durante 1 hora a 37° C. O VEGF165 recombinante humano em meio definido foi depois adicionado a todos os reservatórios em uma concentração de 1,56 nM. As placas foram incubadas durante 72 horas a 37° C e depois MTS (reagente downen, Promega) adicionado e as placas foram incubadas durante um adicional de 4 horas. Finalmente, as placas foram lidas em um espectrofotômetro a 450/570 nm. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 27. O receptor de controle Tie2-Fc não bloqueia a proliferação de célula induzida pelo VEGF165 em nenhuma concentração ao passo que o Flt1D2.FlklD3.FcΔC1(a) bloqueia 1,56 nM de VEGF165 com uma meia dose máxima de 0,8 nM. Flt1(1-3)-Fc e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) são menos eficazes em bloquear VEGF165 neste ensaio com uma meia dose máxima de ~ 2 nM. O VEGF165 sozinho dá uma leitura de 1,2 unidades de absorbância e o fundo é de 0,38 unidades de absorbância.

Exemplo 25: Estequiometria de Ligação de Receptores Flt Modificados ao VEGF165

(a) Análise de BIAcore

A estequiometria de interação de Flt1D2FlklD3.FcΔC1(a) e

VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) com VEGF165 humano foi determinada medindo-se o nível de ligação de saturação do VEGF às superfícies de Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) ou VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) ou medindo-se a concentração de VEGF165 necessário para impedir completamente a ligação de Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) ou VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) à superfície da lasca de BIAcore com VEGF.

Os receptores Flt modificados Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) e VEGFR1R2-Fc Δ C1(a), foram capturados com um anticorpo específico anti-Fc que foi primeiro imobilizado em uma lasca de Biacore (BIACORE) usando a química de ligação de amina. Uma superfície de anticorpo em branco foi usada como um controle negativo. O VEGF165 foi injetado a uma concentração de 1 nM, 10 nM e 50 nM nas superfícies de Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) e VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) a 10 μ l/min durante uma hora. Um sinal de ligação em tempo real foi registrado e a ligação de saturação foi obtida na extremidade de cada injeção. A estequiometria de ligação foi calculada como uma relação molar do VEGF165 ligado para o Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) ou VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) imobilizados usando o fator de conversão de 1000 RU equivalente a 1 ng/ml. O resultado indicou a estequiometria de ligação de uma molécula dimérica de VEGF165 por uma molécula de Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) ou VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) (Figura 28).

Em solução, Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) ou VEGFR1R2-Fc Δ C1(a) a uma concentração de 1 nM (estimada ser 1000 vezes mais alta do que o KD do Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) ou da interação VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)/VEGF165) foram misturados com concentrações variadas de VEGF165. Depois de uma hora de incubação, as concentrações do Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) livre em solução foram medidas como um sinal de ligação a uma superfície de VEGF165 ligado à amina. Uma curva de calibração foi usada para converter o sinal de ligação do BIAcore ao Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a) para a sua concentração molar. Os dados mostraram que a adição de 1 nM de VEGF165 na solução de Flt1D2Flk1D3.Fc Δ C1(a)

bloqueou completamente a ligação de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) à superfície do VEGF165. Este resultado sugeriu a estequiometria de ligação de uma molécula de VEGF165 por uma molécula de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) (Figura 29 e Figura 30). Quando a concentração de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) foi plotada como uma função da concentração de VEGF165 adicionada, a curva da porção linear foi de -1,06 para Flt1D2Flk1D3.FcOC1(a) e de -1,07 para VEGFR1R2-FcΔC1(a). A magnitude da curva, muito próxima a uma negativa, foi indicativa de que uma molécula de VEGF165 liga-se a uma molécula de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) ou de VEGFR1R2-FcΔC1(a).

(b) Cromatografia de Exclusão de Tamanho

Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) foi misturado com um excesso de 3 vezes de VEGF165 e o complexo de receptor-ligante foi purificado usando-se uma coluna de cromatografia de exclusão de tamanho Pharmacia Superose 6. O complexo de receptor-ligante foi depois incubado em um tampão contendo cloridreto de guanidina 6 M de modo a dissociá-lo em suas proteínas componentes. A Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) foi separada do VEGF165 usando-se a coluna de cromatografia de exclusão de tamanho Superose 6 conduzida em cloreto de guanidínio 6 M. De modo a determinar a estequiometria do complexo, diversas injeções de Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) e VEGF165 foram feitas e a altura do pico ou a intensidade de pico integrada foram plotadas como uma função da concentração da proteína injetada. A calibração foi feita sob condição idêntica a uma usada na separação dos componentes do complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF. A quantificação da composição do complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF foi com base nas curvas de calibração. O resultado deste experimento são apresentados na Figura 28, que mostra a relação de VEGF165 para Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) em um complexo para ser 1:1.

Exemplo 26: Determinação da Estequiometria de Ligação do Complexo de Flt1D2Flk1D3FcΔC1(a)/VEGF165 pela Cromatografia de Exclusão de Tamanho

Preparação do Complexo Flt1D2Flk1D3FcΔC1(a)/VEGF165

VEGF165 (concentração = 3,61 mg/ml) foi misturado com Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) transitoriamente expressado em célula CHO (concentração = 0,9 mg/ml) em relação molar de 3:1 (VEGF165:Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)) e incubados durante a noite a 4° C.

(a) Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) sob Condições Nativas

Para separar o complexo do excesso de VEGF165 não ligado, 50 µl do complexo foram carregados em uma Pharmacia Superose 12 PC 3.2/30 que foi equilibrada em tampão de PBS. A amostra foi eluída com o mesmo tampão na razão de fluxo de 40 µl/min. na temperatura ambiente. Os resultados desta SEC são mostrados na Figura 31. O Pico #1 representa o complexo e o pico #2 representa VEGF165 não ligado. As frações eluídas entre 1,1 e 1,2 ml foram combinadas e cloridreto de guanidínio (GuHCl) foi adicionado para uma concentração final de 4,5 M para dissociar o complexo.

(b) Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) sob Condições Dissociativas

Para separar os componentes do complexo receptor-ligante e para determinar a sua relação molar, 50 µl de complexo dissociado como descrito acima foi carregado em uma Superose 12 PC 3.2/30 equilibrada em GuHCl 6 M e eluída com a mesma solução em uma razão de fluxo de 40 µl/min. na temperatura ambiente. Os resultados desta SEC são mostrados na Figura 32. O Pico #1 representa Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) e o pico #2 representa VEGF165.

(c) Cálculo da Estequiometria do Complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a):VEGF165

A estequiometria do complexo receptor-ligante foi determinada a partir da área do pico ou da altura do pico dos componentes. As concentrações de VEGF165 e Flt1D2Flk1D3.FcOC1(a) que correspondem à altura do pico ou à área do pico, respectivamente, foram obtidas a partir das

curvas padrão para VEGF165 e Flt1 D2Flk1D3.FcΔC1(a). Para obter uma curva padrão, quatro concentrações diferentes (0,04 mg/ml a 0,3 mg/ml) de cada um dos componentes foram injetadas em uma coluna Pharmacia Superose 12 PC 3.2/30 equilibrada em cloreto de guanidínio 6 M e eluída com a mesma solução na razão de fluxo de 40 µl/min. na temperatura ambiente. A curva padrão foi obtida plotando-se a área de pico ou as alturas de pico vs a concentração de proteína. A razão molar de VEGF165 : Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) determinada a partir da área de pico dos componentes foi de 1,16. A razão molar de VEGF165 : Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) determinada a partir da altura de pico dos componentes foi de 1,10.

Exemplo 27: Determinação da Estequiometria do Complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165 pela Cromatografia de Exclusão de Tamanho com Dispersão de Luz Em linha

Preparação do Complexo

VEGF165 foi misturado com a proteína Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) expressada transitoriamente em CHO na relação molar de 3:1 (VEGF165:Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)) e incubados durante a noite a 4° C.

(a) Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) com Dispersão de Luz Em linha

A coluna de cromatografia de exclusão de tamanho com um detetor de dispersão de luz MiniDawn em linha (Wyatt Technology, Santa Barbara, Califórnia) e detetores de índices de refração (RI) (Shimadzu, Kioto, Japão) foi usada para determinar o peso molecular (MW) do complexo de receptor-ligante. As amostras foram injetadas em uma coluna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada em tampão de PBS e eluída com o mesmo tampão a uma razão de fluxo de 0,5 ml/min. na temperatura ambiente. Como mostrado na Figura 33, o perfil de eluição mostra dois picos. O Pico #1 representa o complexo de receptor-ligante e o pico #2 representa o VEGF165

não ligado. O peso molecular foi calculado a partir dos sinais LS e RI. O mesmo procedimento foi usado para determinar o peso molecular dos componentes individuais do complexo de receptor-ligante. Os resultados destas determinações são como segue: o peso molecular do complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/ VEGF165 na posição de pico é 157 300 (Figura 33), o peso molecular de VEGF165 na posição de pico é 44 390 (Figura 34) e o peso molecular de R1R2 no pico é 113 300 (Figura 35).

Estes dados indicam que a estequiometria do complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF é de 1:1 como corresponde à soma de pesos moleculares para Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) e VEGF165. Importaneamente, este método conclusivamente provou que o complexo Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)/VEGF165 foi na verdade composto apenas de uma molécula de ligante VEGF165 e apenas uma molécula da Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a).

Exemplo 28: Mapeamento de Peptídeo de Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a)

As estruturas de dissulfeto e os sítios de glicosilação na Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) foram determinados por um método de mapeamento de peptídeo. Neste método, a proteína foi primeiro clivada com tripsina. Fragmentos trípticos foram analisados e identificados pela HPLC ligada com espectrometria de massa, além disso a uma técnica de seqüenciamento de terminal N. A redução dos digestos trípticos foi utilizada para auxiliar a identificar fragmentos contendo ligação de dissulfeto. O tratamento do digesto tríptico com PNGase F (Glyko, Novato, CA) foi utilizado para auxiliar a identificar os fragmentos com sítios de glicosilação ligados em N. Os resultados estão resumidos na Figura 36 anexa.

Existe um total de dez cisteínas na Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a); seis delas pertencem à região Fc. Cys27 foi confirmada estar ligada pelo dissulfeto à Cys76. Cys121 é confirmada estar ligada pelo dissulfeto à Cys182. As primeiras duas cisteínas na região Fc (Cys211 e Cys214) formam uma ligação de dissulfeto intermolecular com as mesmas duas cisteínas em

uma outra cadeia de Fc. Entretanto, porque estas duas cisteínas não podem ser enzimaticamente separadas uma da outra, não pode ser determinado se a ligação de dissulfeto está ocorrendo entre as mesmas cisteínas (Cys211 a Cys211, por exemplo) ou entre Cys211 e Cys214. A Cys216 é confirmada estar ligada pelo dissulfeto à Cys306. Cys 352 é confirmada estar ligada pelo dissulfeto à Cys410.

Existem cinco sítios de glicosilação ligados em N em Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a). Todos os cinco deles foram descobertos estar glicosilados em graus variáveis. A glicosilação completa foi observada em Asn33 (seqüência de aminoácido NIT), Asn193 (seqüência de aminoácido NST), e Asn282 (seqüência de aminoácido NST). Além disso, a glicosilação parcial é observada em Asn65 e Asn120. Os sítios de glicosilação estão realçados por sublinhado na Figura 36.

Exemplo 29: Análise Farmacocinética de Receptores Flt modificados

(a) Análise Farmacocinética de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) e VEGFR1R2-FcΔC1 (a)

Camundongos Balb/c (25 a 30 g) foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) transitoriamente expressada em CHO, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) estávelmente expressada em CHO e VEGFR1R2-FcΔC1(a) transitoriamente expressada em CHO. Os camundongos foram sangrados na cauda em 1, 2, 4, 6, 24 horas, 2 dias, 3 dias e 6 dias depois da injeção. Os soros foram ensaiados em um ELISA planejado para detectar Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) ou VEGFR1R2-FcΔC1(a). O ELISA envolve revestir uma placa de ELISA com VEGF165, a ligação para detectar Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) ou VEGFR1R2-FcΔC1(a) e reportando com um anticorpo anti-Fc ligado a peroxidase de rábano. Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 37. A T_{max} para Flt1(1-3)-Fc (A40) foi em 6 horas enquanto a T_{max} para a Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) transitória e estável e a VEGFR1R2-FcΔC1(a) transitória foi de 24 horas. A C_{max} para a

Flt1(1-3)-Fc (A40) foi de 8 µg/ml. Para ambas as transitórias (Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e VEGFR1R2-FcΔC1(a)) a C_{max} foi de 18 µg/ml e a C_{max} para a VEGFR1R2-FcΔC1(a) estável foi de 30 µg/ml.

(b) Análise Farmacocinética de Flt1(1-3)-Fc (A40),

5 Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a)

Camundongos Balb/c (25 a 30 g) foram subcutaneamente injetados com 4 mg/kg de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) transitoriamente expressada em CHO e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) transitoriamente expressada em CHO. Os camundongos foram sangrados na
10 cauda em 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 15 e 20 dias depois da injeção. Os soros foram ensaiados em um ELISA planejado para detectar Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). O ELISA envolve revestir uma placa de ELISA com 165, ligante o Flt1(1-3)-Fc, Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) ou Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) e reportando com
15 um anticorpo anti-Fc ligado a peroxidase de rábano. A Flt1(1-3)Fc (A40) não pode mais ser detectada no soro após o dia 5 ao passo que a Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) e a Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) foram detectáveis durante 15 dias ou mais. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 38.

20 **Exemplo 30: Avaliação da capacidade da Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) para Inibir o Desenvolvimento de Tumor *In Vivo***

Para avaliar a capacidade da Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) para inibir o desenvolvimento de tumor *in vivo* um modelo em que as suspensões de célula de tumor são implantadas subcutaneamente no flanco direito de
25 camundongos machos com imunodeficiência grave combinada (SCID) foi utilizado. Duas linhas de célula, a linha de célula de fibrossarcoma HT-1080 humano (ATCC acesso N° CCL-121) e a linha de célula de glioma C6 de rato (ATCC acesso N° CCL-107), cada uma das quais exibiram morfologias e características de desenvolvimento distintamente diferentes, foram usadas
30 neste ensaio. A primeira dose de Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) (a 25 mg/Kg ou

como indicado nas Figuras 39 e 40) foi dada no dia da implantação do tumor. Os animais subsequentemente receberam injeções subcutâneas de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) ou veículo dia sim dia não (EOD) ou duas vezes por semana (2X/semana) por um período de 2 semanas. Depois de 2 semanas, os animais foram perfusados com fixador, os tumores foram removidos e as amostras foram embaralhadas às cegas. O volume do tumor foi determinado medindo-se o comprimento e a largura de tumores subcutâneos visíveis. Tanto a Flt1(1-3)-Fc (A40) quanto a Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) reduziram significativamente o desenvolvimento dos tumores formados pelas células HT-1080 e C6. Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 39 e na Figura 40.

Exemplo 31: O Efeito de VEGF165 e de Receptores Flt Modificados no Sistema Reprodutivo Feminino

O padrão estereotípico de remodelação vascular que ocorre no útero e no ovário durante o curso do ciclo reprodutivo foi bem caracterizado, tornando estes tecidos particularmente bem adaptados ao estudo de mecanismos que regulam a angiogênese, remodelação vascular e regressão vascular. Na verdade, os estudos de hibridização *in situ* nos tecidos reprodutivos forneceu a primeira evidência clara de que o VEGF atua como um mediador da angiogênese fisiológica em roedores maduros, bem como em seres humanos e primatas não humanos (Phillips *et al*, 1990; Ravindranat *et al*, 1992; Shweiki *et al*, 1993; Kamat *et al*, 1995). Visto que a angiogênese cíclica e a remodelação vascular são características proeminentes do ovário e do útero normais, não é surpreendente que o desenvolvimento anormal de vaso sangüíneo e/ou a disfunção vascular tenham sido descoberto caracterizar muitas condições patológicas que afetam estes órgãos. Além disso, considera-se que estas anormalidades patogênicas vasculares sejam causadas ou perpetuadas pela expressão desregulada de um ou mais fatores angiogênicos ou anti-angiogênicos, mais proeminentemente o VEGF.

Por exemplo, a angiogênese anormal é características da

doença ovariana policística, endometriose e carcinoma endometrial, e em cada caso o VEGF é sobre expressado no tecido afetado (Kamat *et al*, 1995; Shifren *et al*, 1996; Guidi *et al*, 1996; Donnez *et al*, 1998). Considera-se também que a sobre expressão de VEGF desempenhe um papel patogênico no estabelecimento da hiperpermeabilidade vascular sistêmica na síndrome da hiperestimulação ovariana (McClure *et al*, 1994; Levin *et al*, 1998) e na pré eclampsia (Baker *et al*, 1995; Sharkey *et al*, 1996). Além disso, o VEGF foi implicado como o fator de permeabilidade responsável para a produção de ascites associadas com o carcinoma ovariano e outros tumores (Senger *et al*, 1983; Boockch *et al*, 1995). Os agentes que eficazmente neutralizam as ações biológicas de VEGF podem ser razoavelmente prognosticado ser de benefício terapêutico nas condições acima e relacionadas.

A angiogênese e a remodelação vascular também são marcas da implantação blastocística e do desenvolvimento placentar (Findlay, 1986). O VEGF é fortemente expressado tanto na decídua maternal quanto nos trofoblastos embriônicos, onde considera-se para a primeira expansão estimulada e hiperpermeabilidade da vasculatura uterina durante o período de periimplantação e a formação subsequentemente mediada de ambos os componentes maternal e embriônico da vasculatura placentar (Shweiki *et al*, 1993; Cullinan-Bove e Koos, 1993; Chakraborty *et al*, 1995; Das *et al*, 1997). O VEGF também é requerido para a angiogênese lútea e a secreção de progesterona associada necessária para preparar o útero para a implantação (Ferrara *et al*, 1998). Assim, os agentes que inibem as ações biológicas do VEGF podem provar serem úteis como agentes contraceptivos (impedindo a implantação) ou como um abortifaciente nos estágios iniciais da gestação. A última aplicação poderia encontrar uso particular como uma intervenção não cirúrgica para o término de gravidez ectópica.

Embora a expressão dos receptores de VEGF seja amplamente confinado ao endotélio vascular em tecidos reprodutivos normais, a Flt1 também é expressada pelos trofoblastos na placenta tanto nos seres humanos

quanto nos animais (Clark *et al*, 1996; He *et al*, 1999) onde foi proposto desempenhar um papel na invasão de trofoblasto. Interessantemente, tanto a Flt1 quanto a KDR (Flk1) são expressadas pela linha de célula de coriocarcinoma BeWo (Charnock-Jones *et al*, 1994), e VEGF foi mostrado promover a síntese e a fosforilação da tirosina da MAP quinase nestas células. Além disso, os carcinomas ovarianos primários e metastáticos não apenas para expressar alto níveis de VEGF, mas - além disso para o endotélio vascular - as próprias células de tumor expressam KDR e/ ou Flt1 (Boocock *et al*, 1995). Estas descobertas sugerem que o VEGF pode estar não apenas criticamente envolvido na geração e manutenção da vasculatura de tumor, mas que pelo menos em alguns tumores de origem reprodutiva o VEGF pode auxiliar um papel autócrino, sustentando diretamente a sobrevivência e a proliferação das células de tumor. Assim os agentes que bloqueiam as ações do VEGF pode ter aplicações particularmente benéficas para o tratamento de tumores de origem reprodutiva.

Métodos e Resultados

(a) Estimativa da Hiperpermeabilidade Uterina Induzida pelo VEGF

A gonadotrofina do soro de égua prenha (PMSG) foi subcutaneamente injetada (5 IU) para induzir a ovulação em ratos fêmeas na pré puberdade. Isto resulta em um aumento repentino de estradiol após 2 dias que por sua vez causa uma indução de VEGF no útero. É relatado que esta indução resulta na hiperpermeabilidade do útero e um aumento no peso do útero úmido 6 horas depois e, portanto, pode ser potencialmente bloqueada pelos receptores Flt modificados Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.FlklD3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a). Neste modelo *in vivo*, o peso normal do útero de rato é de cerca de 50 mg e este pode ser induzido para 300 a 350 mg pela PMSG. A dissecação do tecido revela que todo este peso é água. A injeção subcutânea de Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2.FlklD3.FcΔC1(a) e Flt1D2.VEGFR3D3.FcΔC1(a) a 25mg/kg em 1

hora depois da injeção de PMSG resulta em uma inibição de cerca de 50 % do aumento no peso uterino úmido. Aumentar a dose do receptor Flt modificado não reduz mais o aumento no peso úmido sugerindo que existe um componente independente do VEGF para este modelo. Os resultados deste experimento são mostrados na Figura 41.

(a) Estimativa de angiogênese de corpo lúteo usando-se progesterona como uma leitora

A gonadotrofina do soro de égua preta (PMSG) foi subcutaneamente injetada (5 IU) para induzir a ovulação em ratos fêmeas na pré puberdade. Isto resulta em um funcionamento completo do corpo lúteo contendo uma densa rede de vasos sanguíneos depois de 4 dias que permite a secreção de progesterona na corrente sanguínea de modo a preparar o útero para a implantação do útero. A indução de angiogênese no corpo lúteo requer o VEGF; portanto, bloquear o VEGF pode resultar em uma falta de novos vasos sanguíneos e assim uma falta de progesterona secretada na corrente sanguínea. Neste modelo *in vivo*, os níveis de repouso de progesterona são de cerca de 5 ng/ml e estes podem ser induzidos a um nível de 25 a 40 ng/ml depois da PMSG. A injeção subcutânea de Flt1(1-3)-Fc (A40) ou Flt1D2.Flk1D3.FcΔC1(a) a 25 mg/kg ou 5 mg/kg em 1 hora, depois da injeção de PMSG resulta em uma completa inibição da indução de progesterona no dia 4. Os resultados deste experimento são mostrados nas Figuras 42A a 42B.

Exemplo 33: Análise Farmacocinética de Flt1(1-3)-Fc (A40) e Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizado

A Flt1(1-3)-Fc foi polietileno glicolizada com PEG 10kD ou PEG 20kD e testada em camundongos balb/c quanto ao seu perfil farmacocinético. Ambas as formas de Flt1(1-3)-Fc polietileno glicolizada foram descobertas ter perfis de PK muito melhores do que a Flt1(1-3)-Fc (A40), com a T_{max} ocorrendo em 24 horas para as moléculas polietileno glicolizadas como oposto a 6 horas para a Flt1(1-3)-Fc (A40).

Exemplo 34: ELISA de VEGF165 para Testar a Afinidade de Variantes de Receptor Flt1 Modificado

10 pM de VEGF165 foram incubados durante a noite na temperatura ambiente com variantes de receptor Flt1 modificado variando de 160 pM a 0,1 pM. As variantes de receptor Flt1 modificado usadas neste experimento foram Flt1(1-3)-Fc, Flt1(1-3)-Fc (A40), Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a) transitoriamente expressada, Flt1D2VEFGFR3D3FcΔC1(a) transitoriamente expressada, Flt1-(1-3_{NAS})-Fc, Flt1(1-3_{R->C})-Fc e Tie2-Fc. A Flt1(1-3_{NAS})-Fc é uma versão modificada da Flt1(1-3)-Fc em que a sequência de aminoácido KNKRASVRRR altamente básica é substituída pela NASVNGSR, resultando na incorporação de dois novos sítios de glicosilação e uma redução líquida de cinco cargas positivas, ambas com o propósito de reduzir os efeitos desfavoráveis desta sequência em relação ao PK. A Flt1(1-3_{R->C})-Fc é uma modificação em que um único resíduo de arginina (R) dentro da mesma sequência de aminoácido básico é mudado para uma cisteína (C) (KNKRASVRRR -> KNKCASVRRR) para permitir a polietileno glicolização naquele resíduo, que pode depois proteger a região básica de exercer os seus efeitos desfavoráveis sobre o PK. Depois da incubação a solução foi transferida para uma placa contendo um anticorpo de captura para VEGF165 (R&D). A quantidade de VEGF165 livre foi depois determinada usando-se um anticorpo para reportar o VEGF165. Isto mostrou que a variante do receptor Flt1 modificado com a afinidade mais alta para o VEGF165 (determinada como a quantidade mais baixa de VEGF165 livre) foi a Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a), seguida pela Flt1(1-3)-Fc e Flt1(1-3)-Fc (A40) e depois pelas Flt1(1-3_{R->C})-Fc, Flt1(1-3_{NAS})-Fc e Flt1D2VEFGFR3D3-FcΔC1(a). A Tie2Fc não tem nenhuma afinidade com o VEGF165.

miada do grupo que consiste em:

seqüência de nucleotídeo apresentada e

seqüência de nucleotídeo apresentada e

seqüência de nucleotídeo apresentada e

Vetor, caracterizado pelo fato de

nucleico como definida na reivindicação

Vetor de expressão caracterizado

molécula de ácido nucleico como defin

molécula de ácido nucleico é funcional

ole de expressão.

Sistema de vetor hospedeiro para

são, caracterizado pelo fato de que co

definido na reivindicação 3, em um

Fig.1.

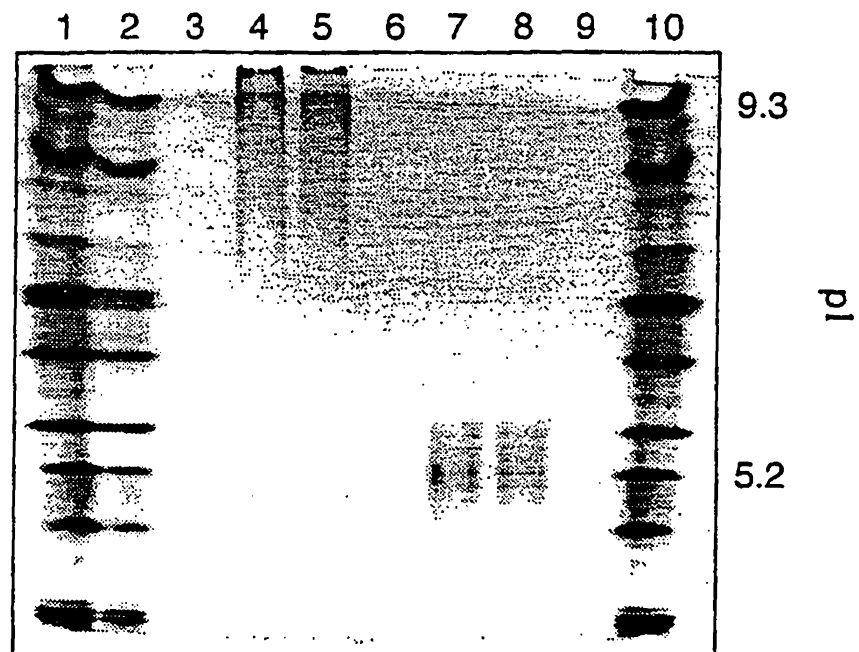


Fig.2.

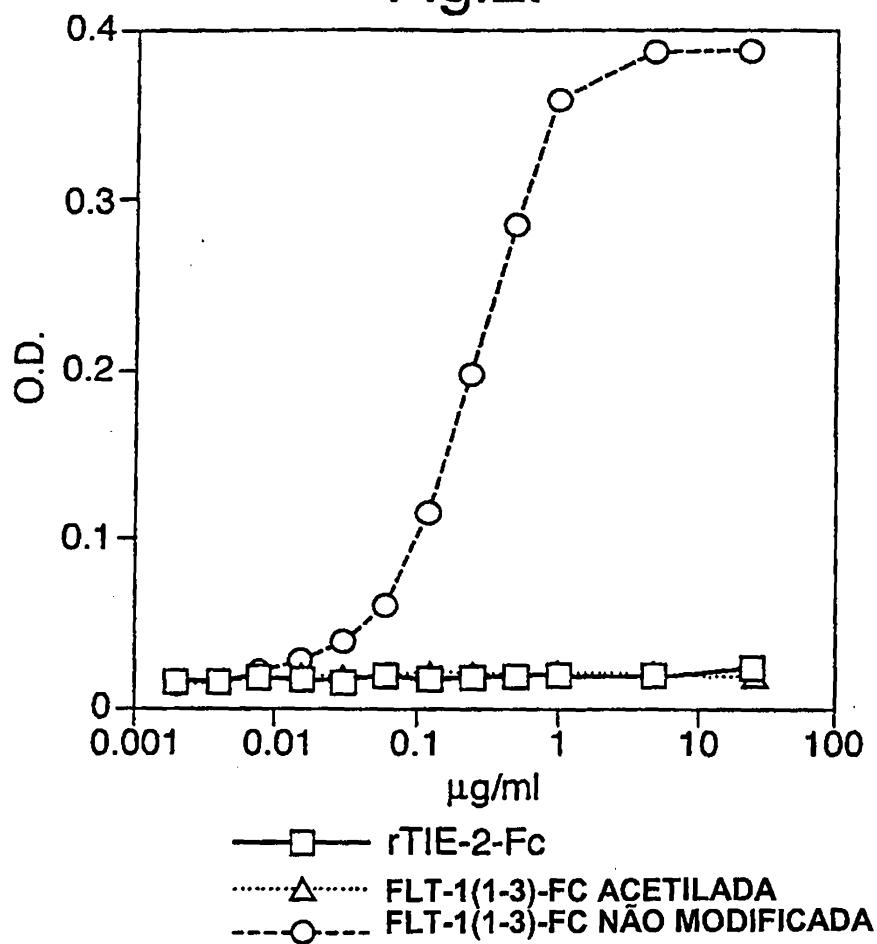
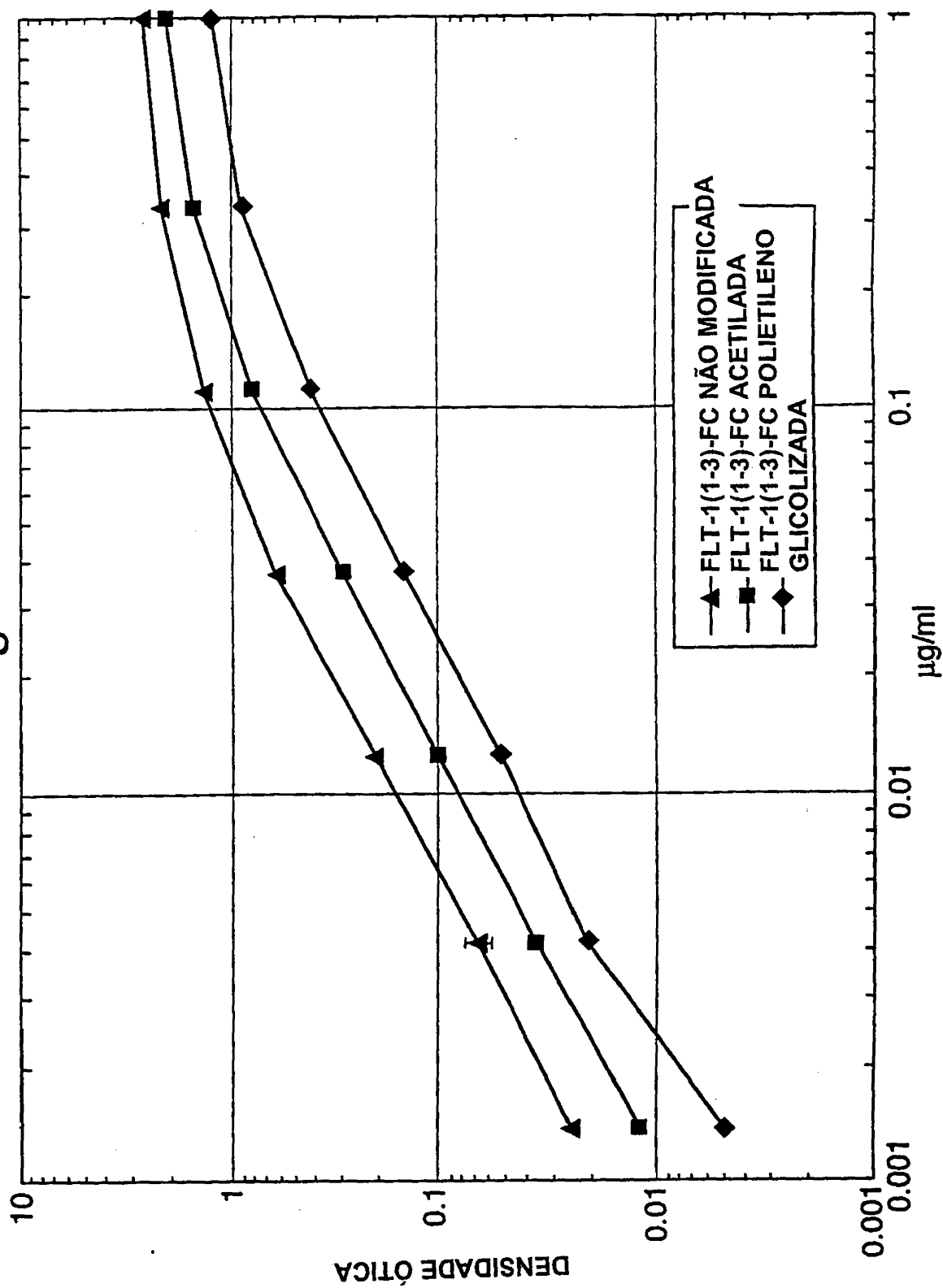


Fig.4.



P 10011907

Fig.5.

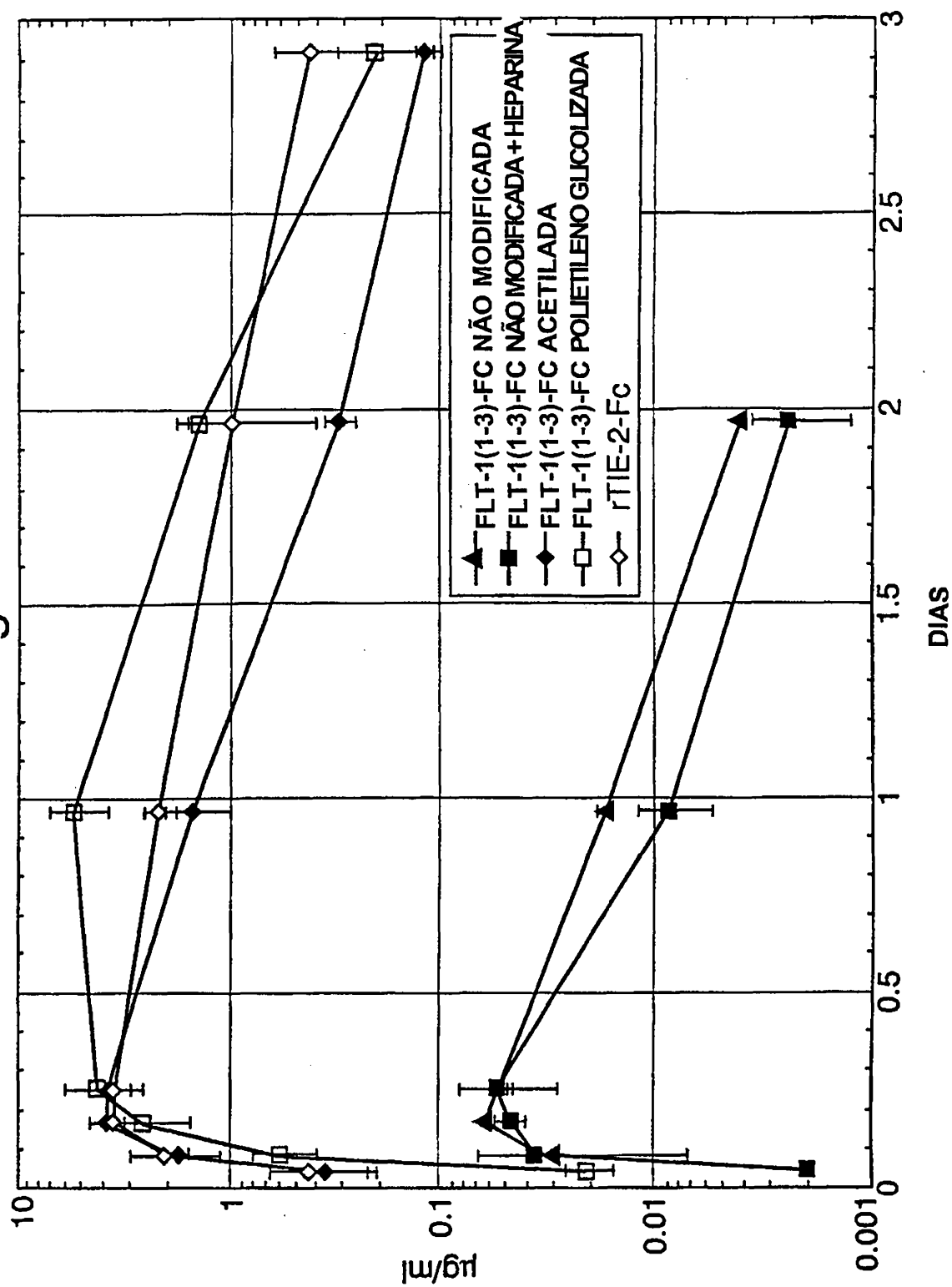


Fig.6A.

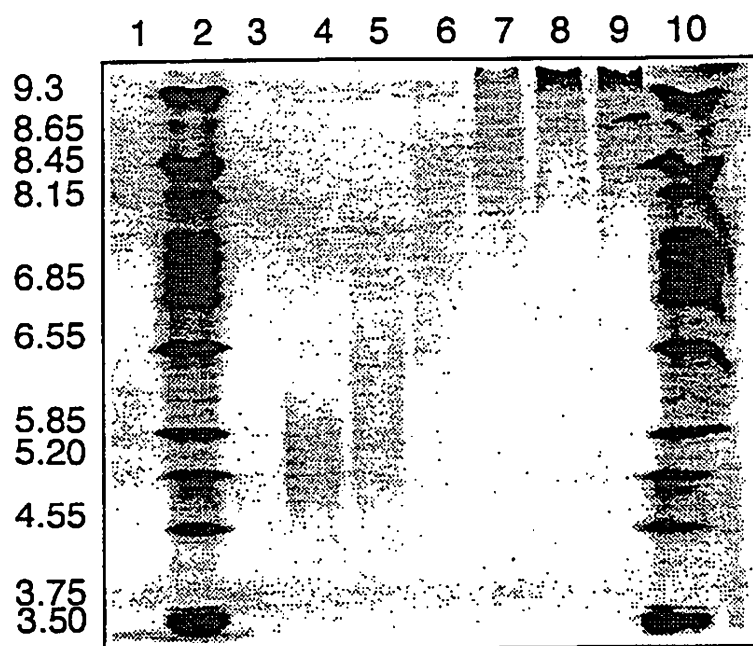
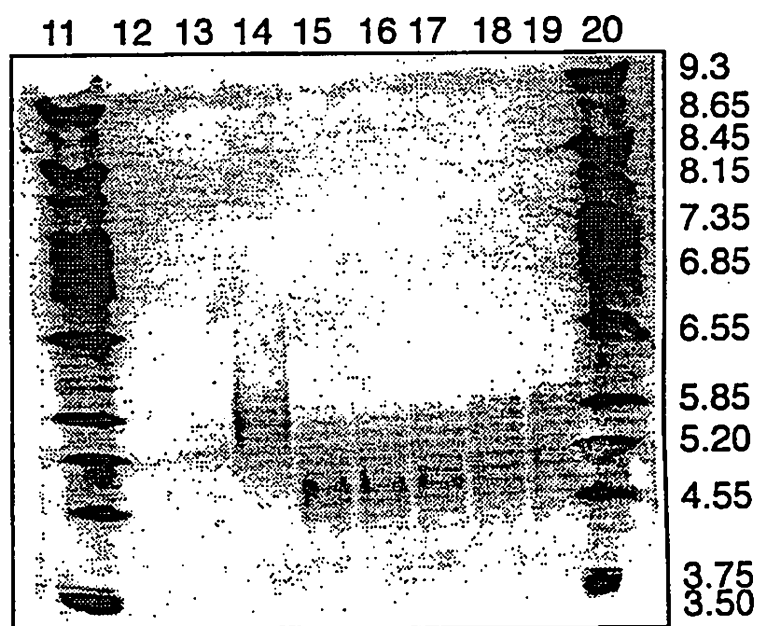


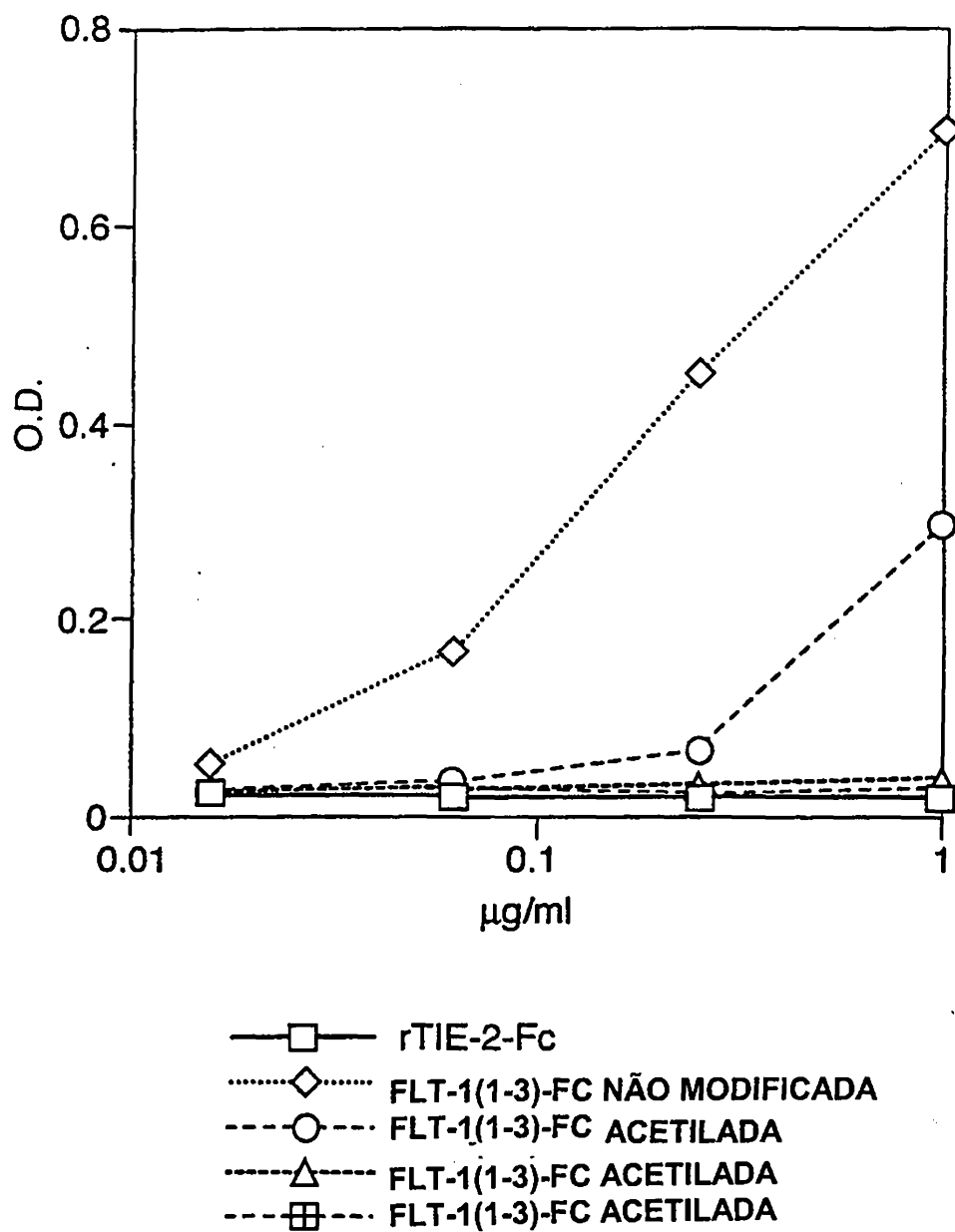
Fig.6B.



6/55

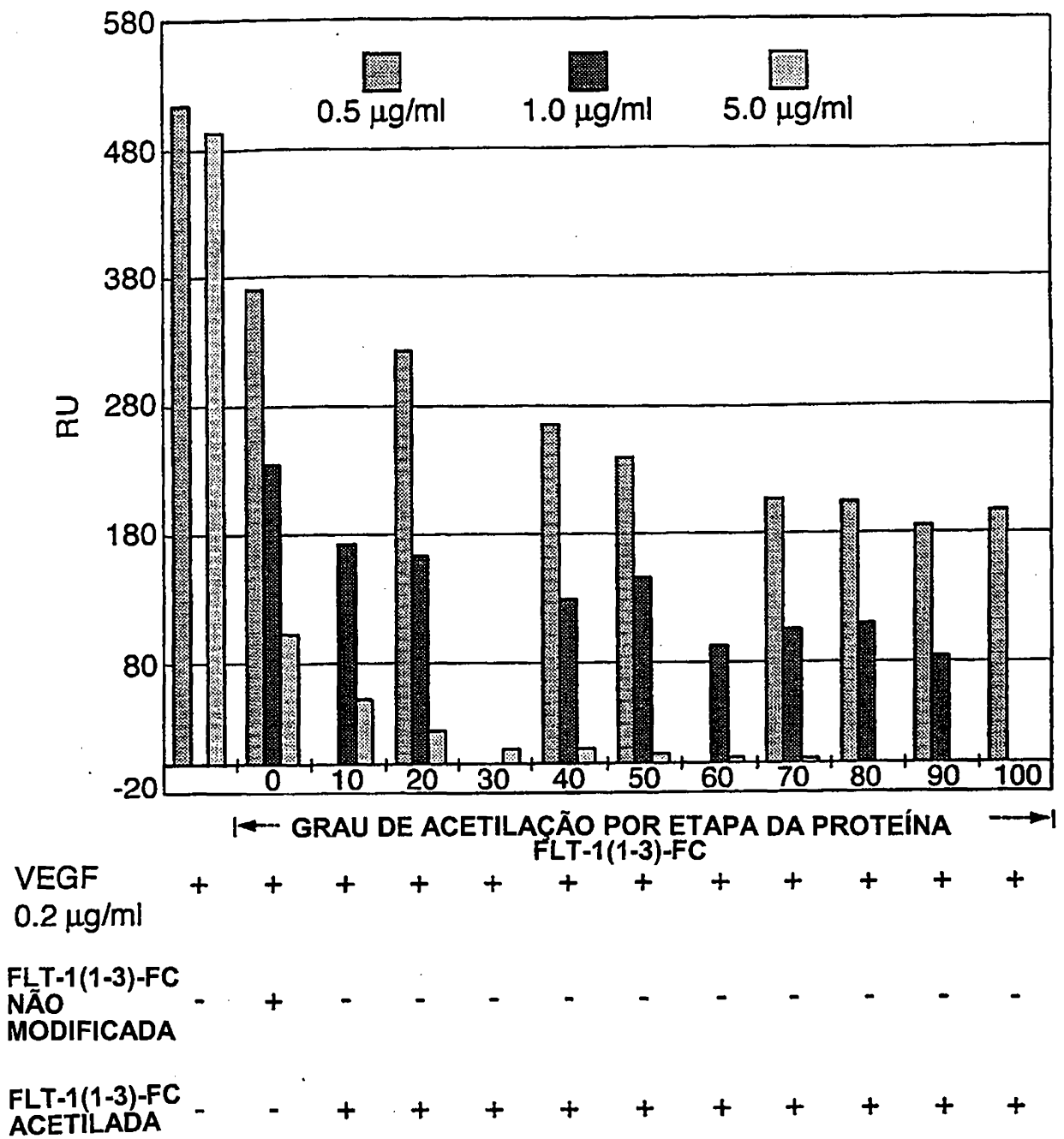
P10011407

Fig.7.



10

Fig.8.



P10011407

0

Fig.10A.

10	20	30	40	50	60
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC					
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG					
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>					
70	80	90	100	110	120
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG					
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC					
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>					
130	140	150	160	170	180
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA					
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CCG GTA TTT					
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>					
190	200	210	220	230	240
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC					
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CCG					
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>					
250	260	270	280	290	300
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC					
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG					
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>					
310	320	330	340	350	360
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA					
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT					
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>					
370	380	390	400	410	420
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT					
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA					
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>					
430	440	450	460	470	480
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GTT					
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA					
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>					
490	500	510	520	530	540
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT					
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA					
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>					

P 10011407

Fig. 10B.

550 560 570 580 590 600
 * * * * * * *
 GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
 CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
 Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

610 620 630 640 650 660
 * * * * * * *
 GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
 CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
 Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

670 680 690 700 710 720
 * * * * * * *
 CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
 GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
 Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

730 740 750 760 770 780
 * * * * * * *
 AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
 TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
 Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

790 800 810 820 830 840
 * * * * * * *
 AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AGA GCT TCC GTA AGG CGA
 TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT
 Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg>

850 860 870 880 890 900
 * * * * * * *
 CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA
 GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT
 Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>

910 920 930 940 950 960
 * * * * * * *
 ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA
 TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT
 Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>

970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * * *
 TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT
 AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA
 Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * * *
 GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC
 CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>

P10011407

Fig. 10C.

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * * *
 TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA
 AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * *
 TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC
 ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp>

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * * *
 GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC
 CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * * *
 CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG
 GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys>

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * * *
 TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA
 ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys>

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * * *
 GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
 CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys>

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 * * * * * *
 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG
 TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 * * * * * *
 TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC
 ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser>

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 * * * * * *
 GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG
 CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly>

12/55

P10011407

Fig.10D.

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 * * * * * * * *
 AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC
 TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser>

1690 1700
 * * * *
 CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
 GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***>

Fig.11.

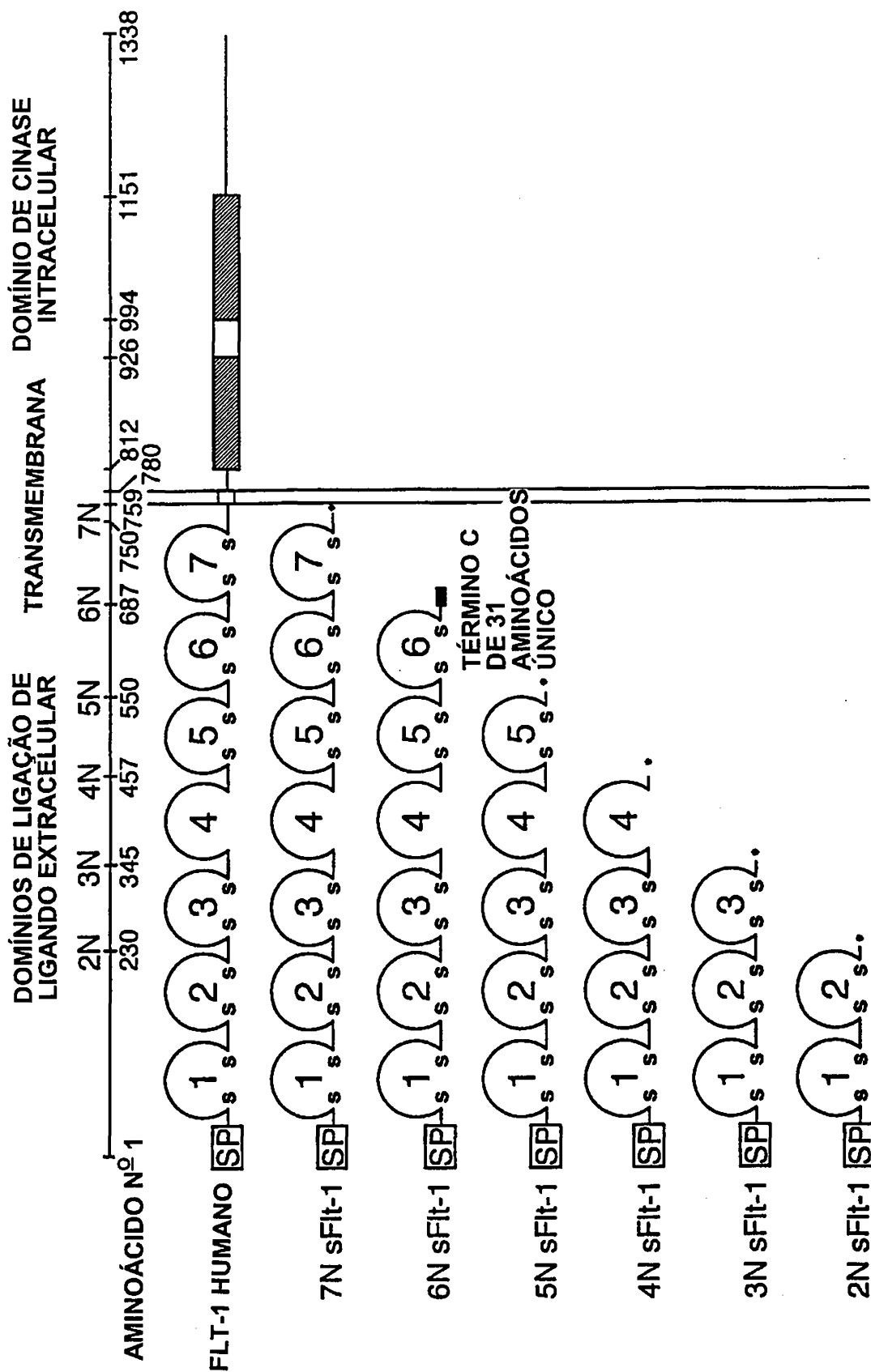


Fig.12A.

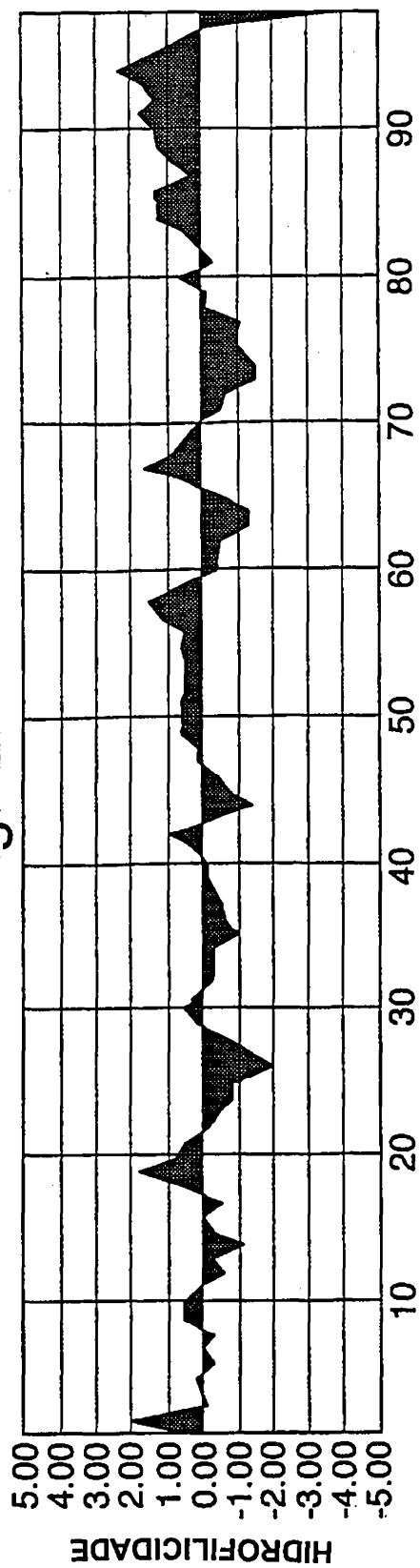


Fig.12B.

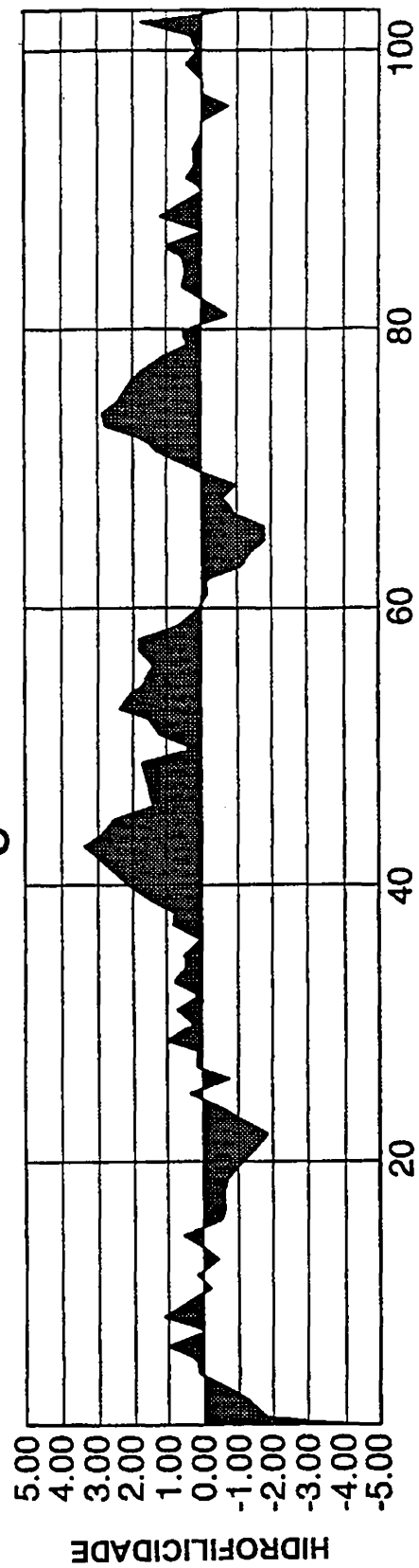


Fig.13A.

P10011407

10	20	30	40	50	60
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC					
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC AC GCG GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG					
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu>					
70	80	90	100	110	120
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT TCA AAA TTA AAA GAT CCT GAA CTG AGT TTA AAA GGC ACC CAG					
TGT CCT AGA TCA AGT CCA AGT TTT AAT TTT CTA GGA CTT GAC TCA AAT TTT CCG TGG GTC					
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln>					
130	140	150	160	170	180
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CAC ATC ATG CAA GCA GGC CAG ACA CTG CAT CTC CAA TGC AGG GGG GAA GCA GCC CAT AAA					
GTG TAG TAC GTT CGT CCG GTC TGT GAC GTA GAG GTT ACG TCC CCC CTT CGT CCG GTA TTT					
His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys>					
190	200	210	220	230	240
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGG TCT TTG CCT GAA ATG GTG AGT AAG GAA AGC GAA AGG CTG AGC ATA ACT AAA TCT GCC					
ACC AGA AAC GGA CTT TAC CAC TCA TTC CTT TCG CTT TCC GAC TCG TAT TGA TTT AGA CCG					
Trp Ser Leu Pro Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala>					
250	260	270	280	290	300
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGT GGA AGA AAT GGC AAA CAA TTC TGC AGT ACT TTA ACC TTG AAC ACA GCT CAA GCA AAC					
ACA CCT TCT TTA CCG TTT GTT AAG ACG TCA TGA AAT TGG AAC TTG TGT CGA GTT CGT TTG					
Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr Ala Gln Ala Asn>					
310	320	330	340	350	360
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CAC ACT GGC TTC TAC AGC TGC AAA TAT CTA GCT GTA CCT ACT TCA AAG AAG AAG GAA ACA					
GTG TGA CCG AAG ATG TCG ACG TTT ATA GAT CGA CAT GGA TGA AGT TTC TTC TTC CTT TGT					
His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr>					
370	380	390	400	410	420
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAA TCT GCA ATC TAT ATA TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT					
CTT AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA					
Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser>					
430	440	450	460	470	480
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT					
CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA					
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val>					
490	500	510	520	530	540
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT					
TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA					
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp>					

Fig.13B.

550 560 570 580 590 600
 * * * * * *
 GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA
 CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT
 Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>

610 620 630 640 650 660
 * * * * * *
 GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT
 CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA
 Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>

670 680 690 700 710 720
 * * * * * *
 CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC
 GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG
 Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>

730 740 750 760 770 780
 * * * * * *
 AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG
 TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC
 Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>

790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
 AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC
 TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG
 Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn>

850 860 870 880 890 900
 * * * * * *
 ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT
 TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA
 Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr>

910 920 930 940 950 960
 * * * * * *
 TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT
 ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA
 Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp>

970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * *
 AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA
 TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT
 Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * *
 GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
 CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr>

17/55

P10011407

Fig.13C.

1090	1100	1110	1120	1130	1140
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC					
GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG					
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp>					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG					
GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC					
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys>					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC					
GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG					
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His>					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC					
GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG					
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala>					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC					
GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG					
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr>					
1390	1400	1410	1420	1430	1440
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA					
GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT					
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys>					
1450	1460	1470	1480	1490	1500
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC					
CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG					
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn>					
1510	1520	1530	1540	1550	1560
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC					
ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG					
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu>					
1570	1580	1590	1600	1610	1620
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG					
TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC					
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu>					

P10011407

Fig.13D.

	1630		1640		1650		1660		1670								
	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA
CGA	GAC	GTG	TTG	GTG	ATG	TGC	GTC	TTC	TCG	GAG	AGG	GAC	AGA	GGC	CCA	TTT	ACT
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>

19/55

P 10011407

Fig.14A.

(9)

		10		20		30		40		50		60							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ATG	GTC	AGC	TAC	TGG	GAC	ACC	GGG	GTC	CTG	CTG	TGC	GCG	CTG	CTC	AGC	TGT	CTG	CTT	CTC
TAC	CAG	TCG	ATG	ACC	CTG	TGG	CCC	CAG	GAC	GAC	ACG	CGC	GAC	GAG	TCG	ACA	GAC	GAA	GAG
Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu>
		70		80		90		100		110		120							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ACA	GGA	TCT	AGT	TCC	GGA	GGT	AGA	CCT	TTC	GTA	GAG	ATG	TAC	AGT	GAA	ATC	CCC	GAA	ATT
TGT	CCT	AGA	TCA	AGG	CCT	CCA	TCT	GGA	AAG	CAT	CTC	TAC	ATG	TCA	CTT	TAG	GGG	CTT	TAA
Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile>
		130		140		150		160		170		180							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ATA	CAC	ATG	ACT	GAA	GGA	AGG	GAG	CTC	GTC	ATT	CCC	TGC	CGG	GTT	ACG	TCA	CCT	AAC	ATC
TAT	GTG	TAC	TGA	CTT	CCT	TCC	CTC	GAG	CAG	TAA	GGG	ACG	GCC	CAA	TGC	AGT	GGA	TTG	TAG
Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile>
		190		200		210		220		230		240							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ACT	GTT	ACT	TTA	AAA	AAG	TTT	CCA	CTT	GAC	ACT	TTG	ATC	CCT	GAT	GGA	AAA	CGC	ATA	ATC
TGA	CAA	TGA	AAT	TTT	TTC	AAA	GGT	GAA	CTG	TGA	AAC	TAG	GGA	CTA	CCT	TTT	GCG	TAT	TAG
Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile>
		250		260		270		280		290		300							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TGG	GAC	AGT	AGA	AAG	GGC	TTC	ATC	ATA	TCA	AAT	GCA	ACG	TAC	AAA	GAA	ATA	GGG	CTT	CTG
ACC	CTG	TCA	TCT	TTC	CCG	AAG	TAG	TAT	AGT	TTA	CGT	TGC	ATG	TTT	CTT	TAT	CCC	GAA	GAC
Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu>
		310		320		330		340		350		360							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ACC	TGT	GAA	GCA	ACA	GTC	AAT	GGG	CAT	TTG	TAT	AAG	ACA	AAC	TAT	CTC	ACA	CAT	CGA	CAA
TGG	ACA	CTT	CGT	TGT	CAG	TTA	CCC	GTA	AAC	ATA	TTC	TGT	TTG	ATA	GAG	TGT	GTA	GCT	GTT
Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln>
		370		380		390		400		410		420							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
ACC	AAT	ACA	ATC	ATA	GAT	GTC	CAA	ATA	AGC	ACA	CCA	CGC	CCA	GTC	AAA	TTA	CTT	AGA	GGC
TGG	TTA	TGT	TAG	TAT	CTA	CAG	GTT	TAT	TCG	TGT	GGT	GCG	GGT	CAG	TTT	AAT	GAA	TCT	CCG
Thr	Asn	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Pro	Arg	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Arg	Gly>
		430		440		450		460		470		480							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
CAT	ACT	CTT	GTC	CTC	AAT	TGT	ACT	GCT	ACC	ACT	CCC	TTG	AAC	ACG	AGA	GTT	CAA	ATG	ACC
GTA	TGA	GAA	CAG	GAG	TTA	ACA	TGA	CGA	TGG	TGA	GGG	AAC	TTG	TGC	TCT	CAA	GTT	TAC	TGG
His	Thr	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Asn	Thr	Arg	Val	Gln	Met	Thr>
		490		500		510		520		530		540							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							
TGG	AGT	TAC	CCT	GAT	GAA	ATT	GAC	CAA	AGC	AAT	TCC	CAT	GCC	AAC	ATA	TTC	TAC	AGT	GTT
ACC	TCA	ATG	GGA	CTA	CTT	TAA	CTG	GTT	TCG	TTA	AGG	GTA	CGG	TTG	TAT	AAG	ATG	TCA	CAA
Trp	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Asp	Gln	Ser	Asn	Ser	His	Ala	Asn	Ile	Phe	Tyr	Ser	Val>

20/55

P10011407

Fig.14B.

550 560 570 580 590 600
 * * * * * * *
 CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT
 GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA
 Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser>

610 620 630 640 650 660
 * * * * * * *
 GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC
 CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG
 Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly>

670 680 690 700 710 720
 * * * * * * *
 GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG
 CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu>

730 740 750 760 770 780
 * * * * * * *
 GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG
 CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg>

790 800 810 820 830 840
 * * * * * * *
 ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC
 TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe>

850 860 870 880 890 900
 * * * * * * *
 AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG
 TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln>

910 920 930 940 950 960
 * * * * * * *
 TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT
 ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn>

970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * * *
 GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC
 CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * * *
 ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG
 TAG AGG TTT CCG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg>

P 1001407

①

1090				1100				1110				1120				1130				1140				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG	GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC					
CTA	CTC	GAC	TGG	TTC	TTG	GTC	CAG	TCG	GAC	TGG	ACG	GAC	CAG	TTT	CCG	AAG	ATA	GGG	TCG					
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	>				
1150				1160				1170				1180				1190				1200				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC	AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT					
CTG	TAG	CGG	CAC	CTC	ACC	CTC	TCG	TTA	CCC	GTC	GGC	CTC	TTG	TTG	ATG	TTC	TGG	TGC	GGA					
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	>				
1210				1220				1230				1240				1250				1260				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	ACC	GTG	GAC	AAG	AGC					
GGG	CAC	GAC	CTG	AGG	CTG	CCG	AGG	AAG	AAG	GAG	ATG	TCG	TTC	GAG	TGG	CAC	CTG	TTC	TCG					
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	>				
1270				1280				1290				1300				1310				1320				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC					
TCC	ACC	GTC	GTC	CCC	TTG	CAG	AAG	AGT	ACG	AGG	CAC	TAC	GTA	CTC	CGA	GAC	GTG	TTG	GTG					
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	>				
1330				1340				1350																
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*													
TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA												
ATG	TGC	GTC	TTC	TCG	GAG	AGG	GAC	AGA	GGC	CCA	TTT	ACT												
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>												

22/55

P 10011407

(12)

Fig.15A.

	10		20		30		40		50		60								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
ATG	GTC	AGC	TAC	TGG	GAC	ACC	GGG	GTC	CTG	CTG	TGC	GCG	CTG	CTC	AGC	TGT	CTG	CTT	CTC
TAC	CAG	TCG	ATG	ACC	CTG	TGG	CCC	CAG	GAC	GAC	ACG	CGC	GAC	GAG	TCG	ACA	GAC	GAA	GAG
Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu>
	70		80		90		100		110		120								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
ACA	GGA	TCT	AGT	TCC	GGA	GGT	AGA	CCT	TTC	GTA	GAG	ATG	TAC	AGT	GAA	ATC	CCC	GAA	ATT
TGT	CCT	AGA	TCA	AGG	CCT	CCA	TCT	GGA	AAG	CAT	CTC	TAC	ATG	TCA	CTT	TAG	GGG	CTT	TAA
Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile>
	130		140		150		160		170		180								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
ATA	CAC	ATG	ACT	GAA	GGA	AGG	GAG	CTC	GTC	ATT	CCC	TGC	CGG	GTT	ACG	TCA	CCT	AAC	ATC
TAT	GTG	TAC	TGA	CTT	CCT	TCC	CTC	GAG	CAG	TAA	GGG	ACG	GCC	CAA	TGC	AGT	GGA	TTG	TAG
Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile>
	190		200		210		220		230		240								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
ACT	GTT	ACT	TTA	AAA	AAG	TTT	CCA	CTT	GAC	ACT	TTG	ATC	CCT	GAT	GGA	AAA	CGC	ATA	ATC
TGA	CAA	TGA	AAT	TTT	TTC	AAA	GGT	GAA	CTG	TGA	AAC	TAG	GGA	CTA	CCT	TTT	GCG	TAT	TAG
Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile>
	250		260		270		280		290		300								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
TGG	GAC	AGT	AGA	AAG	GGC	TTC	ATC	ATA	TCA	AAT	GCA	ACG	TAC	AAA	GAA	ATA	GGG	CTT	CTG
ACC	CTG	TCA	TCT	TTC	CCG	AAG	TAG	TAT	AGT	TTA	CGT	TGC	ATG	TTT	CTT	TAT	CCC	GAA	GAC
Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu>
	310		320		330		340		350		360								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
ACC	TGT	GAA	GCA	ACA	GTC	AAT	GGG	CAT	TTG	TAT	AAG	ACA	AAC	TAT	CTC	ACA	CAT	CGA	CAA
TGG	ACA	CTT	CGT	TGT	CAG	TTA	CCC	GTA	AAC	ATA	TTC	TGT	TTG	ATA	GAG	TGT	GTA	GCT	GTT
Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln>
	370		380		390		400		410		420								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
ACC	AAT	ACA	ATC	ATA	GAT	GTC	CAA	ATA	AGC	ACA	CCA	CGC	CCA	GTC	AAA	TTA	CTT	AGA	GGC
TGG	TTA	TGT	TAG	TAT	CTA	CAG	GTT	TAT	TCG	TGT	GGT	GCG	GGT	CAG	TTT	AAT	GAA	TCT	CCG
Thr	Asn	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Pro	Arg	Pro	Val	Lys	Leu	Leu	Arg	Gly>
	430		440		450		460		470		480								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
CAT	ACT	CTT	GTC	CTC	AAT	TGT	ACT	GCT	ACC	ACT	CCC	TTG	AAC	ACG	AGA	GTT	CAA	ATG	ACC
GTA	TGA	GAA	CAG	GAG	TTA	ACA	TGA	CGA	TGG	TGA	GGG	AAC	TTG	TGC	TCT	CAA	GTT	TAC	TGG
His	Thr	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Asn	Thr	Arg	Val	Gln	Met	Thr>
	490		500		510		520		530		540								
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
TGG	AGT	TAC	CCT	GAT	GAA	AAA	AAT	AAG	AGA	GCT	TCC	GTA	AGG	CGA	CGA	ATT	GAC	CAA	AGC
ACC	TCA	ATG	GGA	CTA	CTT	TTT	TTA	TTC	TCT	CGA	AGG	CAT	TCC	GCT	GCT	TAA	CTG	GTT	TCG
Trp	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Lys	Asn	Lys	Arg	Ala	Ser	Val	Arg	Arg	Arg	Ile	Asp	Gln	Ser>

P10011407

Fig.15B.

(B)

550	560	570	580	590	600
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC AAA GAC					
TTA AGG GTA CGG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG TTT CTG					
Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys Asp>					
610	620	630	640	650	660
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC ACC TCA					
TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG TGG AGT					
Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn Thr Ser>					
670	680	690	700	710	720
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA					
CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA CTG TTT TGA GTG TGT					
Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr>					
730	740	750	760	770	780
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA					
ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT					
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro>					
790	800	810	820	830	840
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC					
TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG					
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp>					
850	860	870	880	890	900
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT					
CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA					
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His>					
910	920	930	940	950	960
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC					
TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG					
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val>					
970	980	990	1000	1010	1020
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC					
GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG					
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn>					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA					
TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT					
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu>					

P10011407

(14)

Fig.15C.

1090	1100	1110	1120	1130	1140
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG					
GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC					
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu>					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG					
TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC					
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly>					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC					
GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG					
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe>					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC					
GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG					
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys>					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
* * *	* *	* *	* *	* *	* *
TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG					
AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC					
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro>					
* GGT AAA TGA CCA TTT ACT Gly Lys ***>					

15

10			20			30			40			50			60				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
ATG	GTC	AGC	TAC	TGG	GAC	ACC	GGG	GTC	CTG	CTG	TGC	GCG	CTG	CTC	AGC	TGT	CTG	CTT	CTC
TAC	CAG	TCG	ATG	ACC	CTG	TGG	CCC	CAG	GAC	GAC	ACG	CGC	GAC	GAG	TCG	ACA	GAC	GAA	GAG
Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu>
70			80			90			100			110			120				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
ACA	GGA	TCT	AGT	TCA	GGT	TCA	AAA	TTA	AAA	GAT	CCT	GAA	CTG	AGT	TTA	AAA	GGC	ACC	CAG
TGT	CCT	AGA	TCA	AGT	CCA	AGT	TTT	AAT	TTT	CTA	GGA	CTT	GAC	TCA	AAT	TTT	CCG	TGG	GTC
Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Lys	Leu	Lys	Asp	Pro	Glu	Leu	Ser	Leu	Lys	Gly	Thr	Gln>
130			140			150			160			170			180				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
CAC	ATC	ATG	CAA	GCA	GGC	CAG	ACA	CTG	CAT	CTC	CAA	TGC	AGG	GGG	GAA	GCA	GCC	CAT	AAA
GTG	TAG	TAC	GTT	CGT	CCG	GTC	TGT	GAC	GTA	GAG	GTT	ACG	TCC	CCC	CTT	CGT	CGG	GTA	TTT
His	Ile	Met	Gln	Ala	Gly	Gln	Thr	Leu	His	Leu	Gln	Cys	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	His	Lys>
190			200			210			220			230			240				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
TGG	TCT	TTG	CCT	GAA	ATG	GTG	AGT	AAG	GAA	AGC	GAA	AGG	CTG	AGC	ATA	ACT	AAA	TCT	GCC
ACC	AGA	AAC	GGA	CTT	TAC	CAC	TCA	TTC	CTT	TCG	CTT	TCC	GAC	TCG	TAT	TGA	TTT	AGA	CGG
Trp	Ser	Leu	Pro	Glu	Met	Val	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Ala>
250			260			270			280			290			300				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
TGT	GGA	AGA	AAT	GGC	AAA	CAA	TTC	TGC	AGT	ACT	TTA	ACC	TTG	AAC	ACA	GCT	CAA	GCA	AAC
ACA	CCT	TCT	TTA	CCG	TTT	GTT	AAG	ACG	TCA	TGA	AAT	TGG	AAC	TTG	TGT	CGA	GTT	CGT	TTG
Cys	Gly	Arg	Asn	Gly	Lys	Gln	Phe	Cys	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Thr	Ala	Gln	Ala	Asn>
310			320			330			340			350			360				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
CAC	ACT	GGC	TTC	TAC	AGC	TGC	AAA	TAT	CTA	GCT	GTA	CCT	ACT	TCA	AAG	AAG	AAG	GAA	ACA
GTG	TGA	CCG	AAG	ATG	TCG	ACG	TTT	ATA	GAT	CGA	CAT	GGA	TGA	AGT	TTC	TTC	TTC	CTT	TGT
His	Thr	Gly	Phe	Tyr	Ser	Cys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Val	Pro	Thr	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Thr>
370			380			390			400			410			420				
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
GAA	TCT	GCA	ATC	TAT	ATA	TTT	ATT	AGT	GAT	ACA	GGT	AGA	CCT	TTC	GTA	GAG	ATG	TAC	AGT
CTT	AGA	CGT	TAG	ATA	TAT	AAA	TAA	TCA	CTA	TGT	CCA	TCT	GGA	AAG	CAT	CTC	TAC	ATG	TCA
Glu	Ser	Ala	Ile	Tyr	Ile	Phe	Ile	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser>
430			440			450			460			470							

P10011407

Fig.16B.

(16)

550	560	570	580	590	600
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA	CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT	Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys>			
610	620	630	640	650	660
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT	CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA	Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr>			
670	680	690	700	710	720
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CTC ACA CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTC CAA ATA AGC ACA CCA CGC CCA GTC	GAG TGT GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG	Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val>			
730	740	750	760	770	780
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AAA TTA CTT AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG	TTT AAT GAA TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC	Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr>			
790	800	810	820	830	840
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
AGA GTT CAA ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT GAA AAA AAT AAG AAC GCT TCC GTA AGG CGA	TCT CAA GTT TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TTG CGA AGG CAT TCC GCT	Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Asn Ala Ser Val Arg Arg>			
850	860	870	880	890	900
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
CGA ATT GAC CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC ATA TTC TAC AGT GTT CTT ACT ATT GAC AAA	GCT TAA CTG GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT	Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys>			
910	920	930	940	950	960
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
ATG CAG AAC AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT TGT CGT GTA AGG AGT GGA CCA TCA TTC AAA	TAC GTC TTG TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT	Met Gln Asn Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys>			
970	980	990	1000	1010	1020
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
TCT GTT AAC ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT AAA GCA GGC CCG GGC GAG CCC AAA TCT TGT	AGA CAA TTG TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT CCG GGC CCG CTC GGG TTT AGA ACA	Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Gly Pro Gly Glu Pro Lys Ser Cys>			
1030	1040	1050	1060	1070	1080
* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC	CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val>			

27/55

P10011407

Fig.16C.

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * * * *
 TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA
 AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * * *
 TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC
 ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp>

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * * * *
 GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC
 CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr>

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * * * *
 CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG
 GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys>

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * * * *
 TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA
 ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys>

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * * * *
 GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG
 CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys>

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 * * * * * * *
 AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG
 TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu>

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 * * * * * * *
 TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC
 ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser>

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 * * * * * * *
 GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG
 CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly>

P10011407

16

Fig.16D.

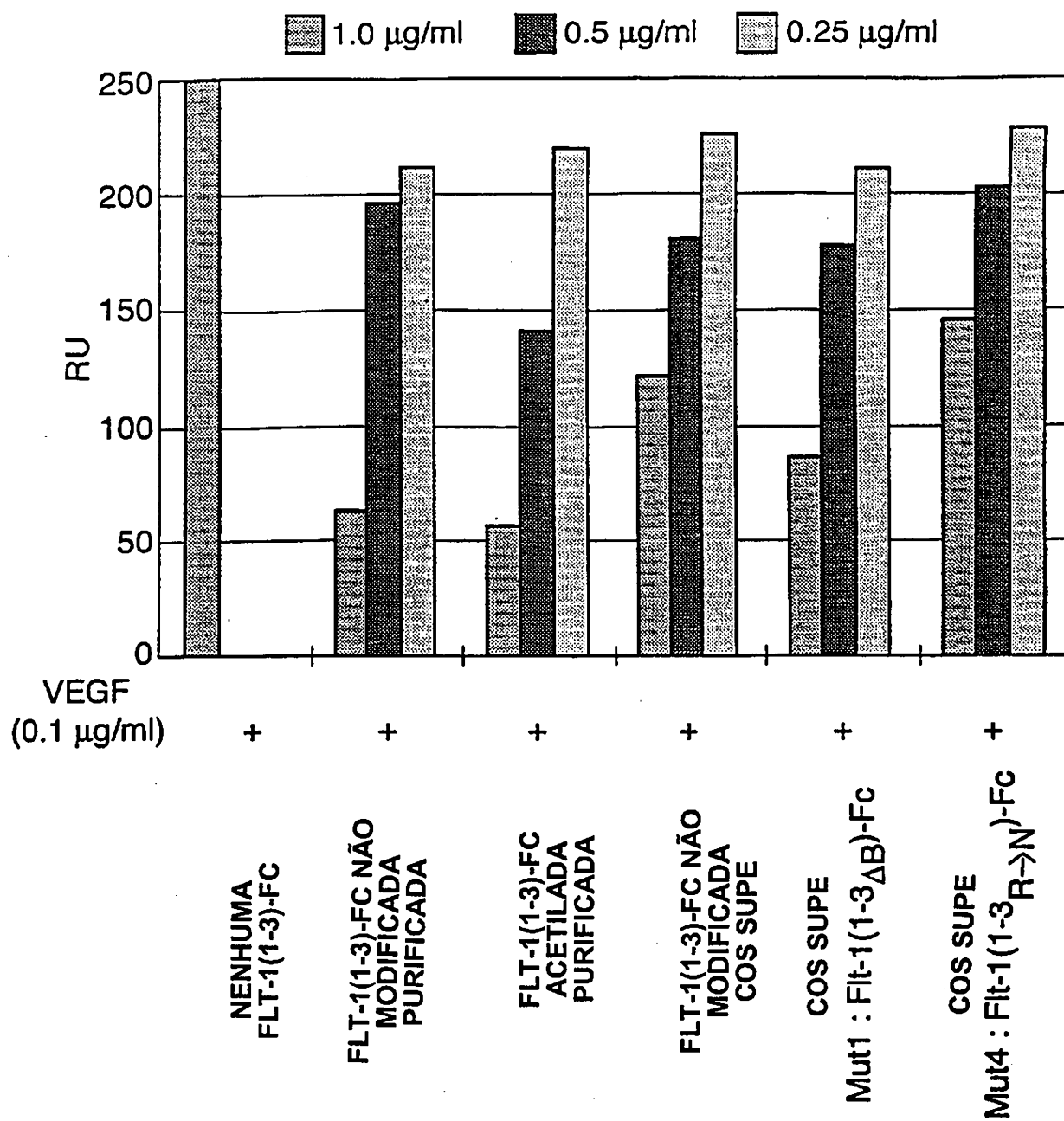
		1630		1640		1650		1660		1670		1680							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT	CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC
TTG	CAG	AAG	AGT	ACG	AGG	CAC	TAC	GTA	CTC	CGA	GAC	GTG	TTG	GTG	ATG	TGC	GTC	TTC	TCG
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser>

		1690		1700					
	*	*	*	*					
CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA		
GAG	AGG	GAC	AGA	GGC	CCA	TTT	ACT		
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	***>		

29/55

P1001407

Fig.17.



30/55

Fig.18.

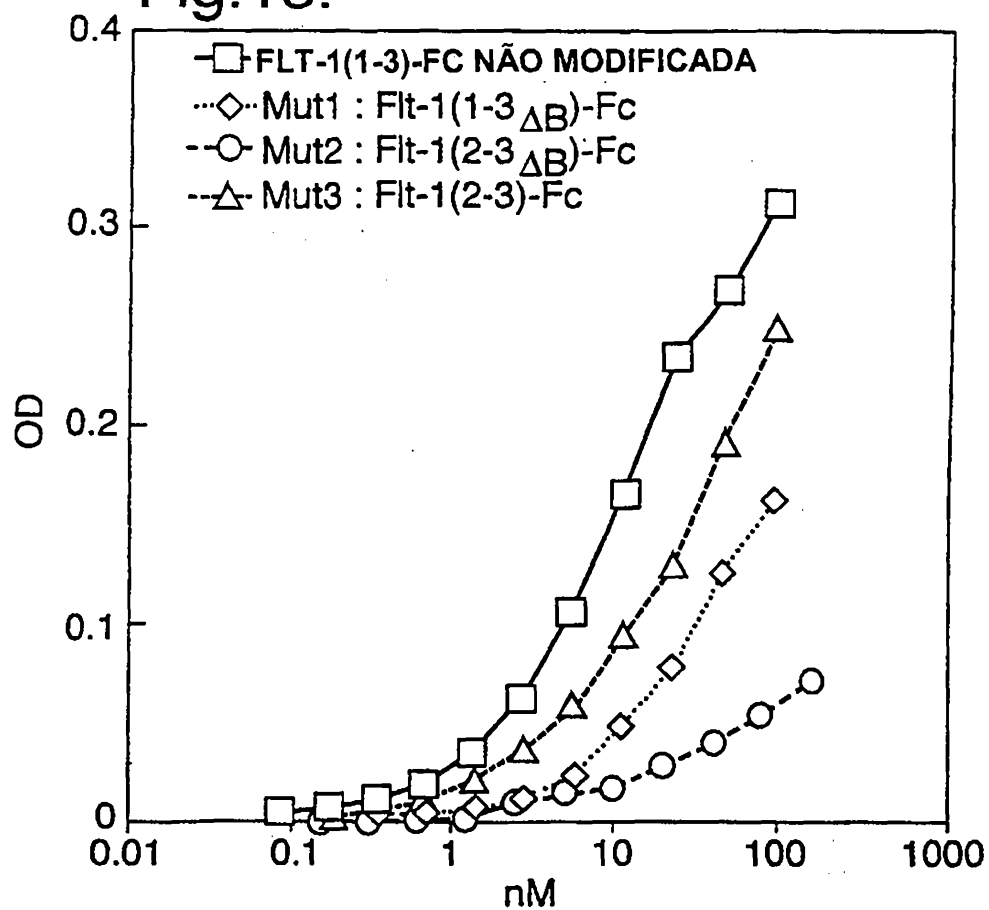
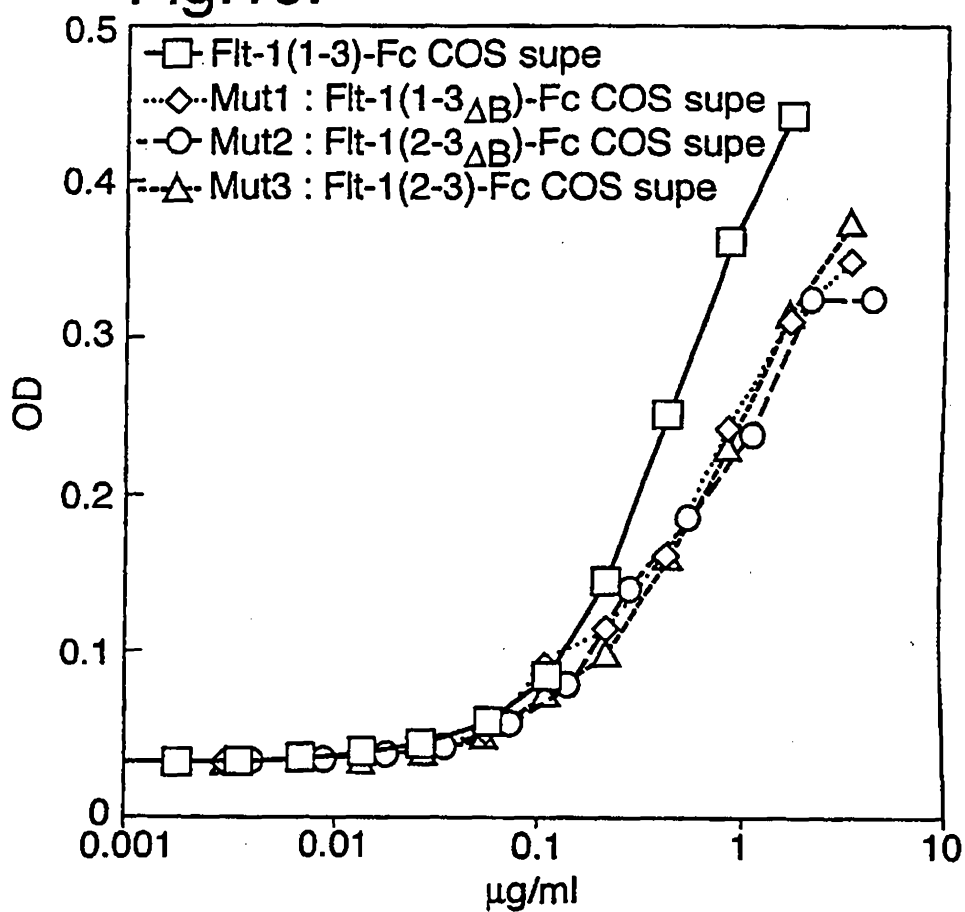


Fig.19.



110035407

Fig.20.

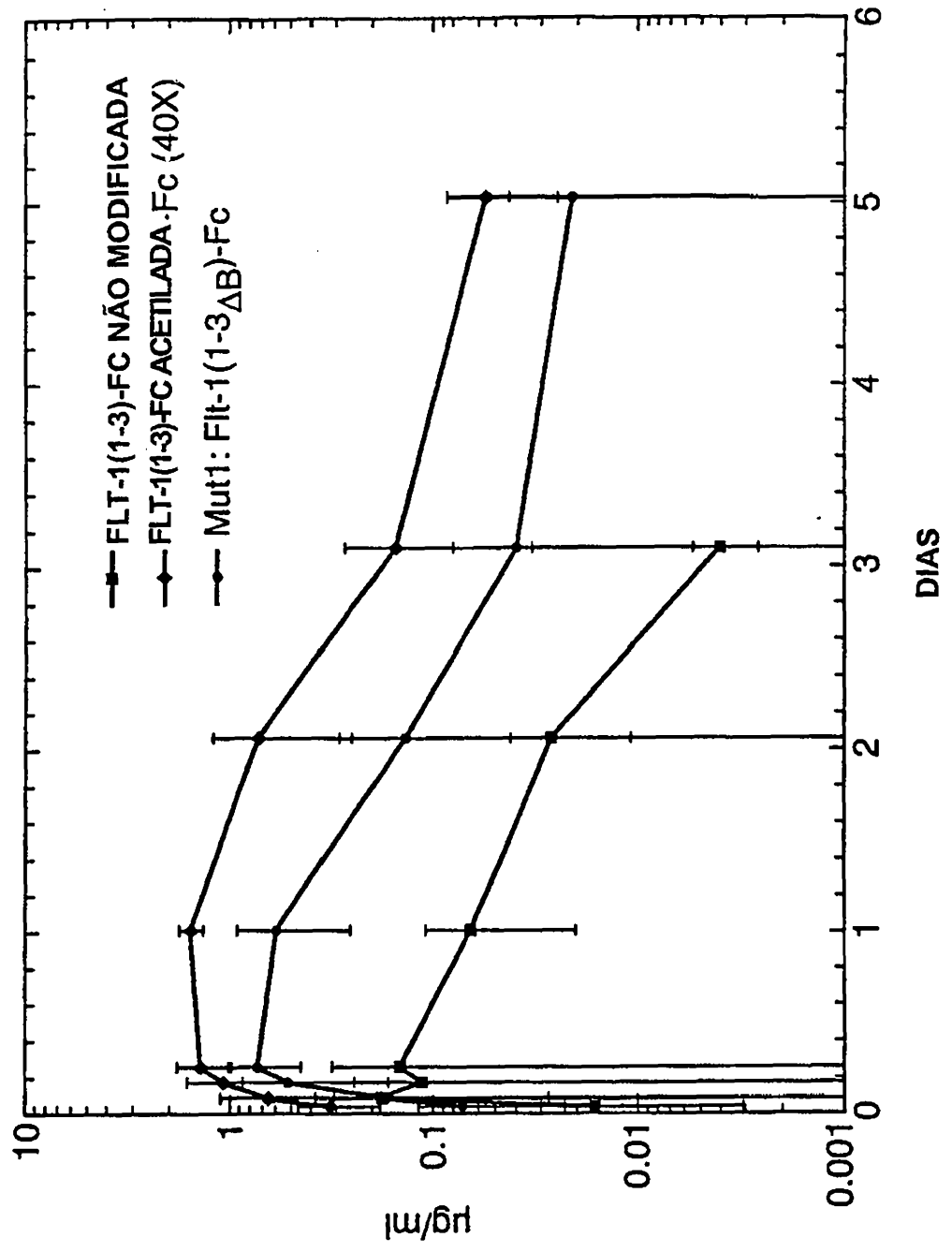


Fig.21A.

>EcoRI_SÍTIO

10 20 30 40 50 60 70 80

AAGCTTGGGCTGCAGGTCGATCGACTCTAGAGGATCGATCCCCGGGCGAGCTCGAATTCGCAACCACCATGGTCAGCTAC
 TTCGAACCCGACGTCAGCTAGCTGAGATCTCCTAGCTAGGGGCCCCGCTCGAGCTTAAGCGTTGGTGGTACCAGTCGATG

M V S Y>
 1 4

>BspEI_PONTE

90 100 110 120 130 140 150 160

TGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTCGT
 ACCCTGTGGCCCCAGGACGACACGCGGACGAGTCGACAGACGAAGAGTGTCTAGATCAAGGCCTCCATCTGGAAAGCA
 W D T G V L L C A L L S C L L L T G S S>

FLT1 SS>

S G>

G R P F V>
 31

170 180 190 200 210 220 230 240

AGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGTTACGTCAC
 TCTCTACATGTCACTTTAGGGGCTTTAATATGTGTACTGACTTCCTTCCCTCGAGCAGTAAGGGACGGCCCAATGCAGTG
 E M Y S E I P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>

57

HFLT1 D2>

250 260 270 280 290 300 310 320

CTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGA
 GATTGTAGTGACAATGAAATTTTTCAAAGGTGAACTGTGAACTAGGGACTACCTTTTGGGTATTAGACCTGTGCATCT
 P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K R I I W D S R>

84

HFLT1 D2>

330 340 350 360 370 380 390 400

AAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTA
 TTCCCGAAGTAGTATAGTTTACGTTGCATGTTTCTTTATCCCGAAGACTGGACACTTCGTTGTGTCAGTTACCCGTAAACAT
 K G F I I S N A T Y K E I G L L T C E A T V N G H L Y>

111

HFLT1 D2>

410 420 430 440 450 460 470 480

TAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCGTCATGGAATTGAACTAT
 ATTCTGTTTGATAGAGTGTGTAGCTGTTTGGTTATGTTAGTATCTACACCAAGACTCAGGCAGAGTACCTTAACCTTGATA
 K T N Y L T H R Q T N T I I D>

HFLT1 D2>

V V L S P S H G I E L>
 137

HFLK1 D3>

Fig.21B.

490 500 510 520 530 540 550 560
 CTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATGTACAGCAAGAACTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCCT
 GACAACCTCTTTTCGAACAGAATTTAACATGTCGTTCTTGACTTGATTTACACCCCTAACTGAAGTTGACCCTTATGGGA
 S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I D F N W E Y P>
 164
 _____HFLK1 D3_____>

570 580 590 600 610 620 630 640
 TCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACCCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTGTAG
 AGAAGCTTCGTAGTCGTATTCTTTGAACATTTGGCTCTGGATTTTGGGTCAGACCCCTACTCTACTTCTTTAAAAACTC
 S S K H Q H K K L V N R D L K T Q S G S E M K K F L S>
 191
 _____HFLK1 D3_____>

650 660 670 680 690 700 710 720
 CACCTTAACTATAGATGGTGTAAACCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGA
 GTGGAATTGATATCTACCACATTGGGCCTCACTGGTTCTTAACATGTGGACACGTCGTAGGTCACCCGACTACTGGTTCT
 T L T I D G V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
 217
 _____HFLK1 D3_____>

>Srf_PONTE
 730 740 750 760 770 780 790 800
 AGAACAGCACATTTGTTCAGGGTCCATGAAAAGGGCCCCGGGCGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCGAGCACCTGAA
 TCTTGTCTGTAAACAGTCCCAGGTACTTTTCCCGGGCCCGCTGTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCTGTGGACTT
 K N S T F V R V H E K>
 _____HFLK1 D3_____>
 G P G>
 _____>
 D K T H T C P P C P A P E>
 244
 _____FCAC1 (A)_____>

810 820 830 840 850 860 870 880
 CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTAC
 GAGGACCCCCCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGTTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAGTG
 L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T>
 271
 _____FCAC1 (A)_____>

890 900 910 920 930 940 950 960
 ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
 TACGCACCACCACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTAC
 C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N>
 297
 _____FCAC1 (A)_____>

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGG
 GGTCTGTGTTTCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTCTGTGCATGGCACACCAGTTCGAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTCTGACC
 A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W>
 324
 _____FCAC1 (A)_____>

Fig.21C.

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
 GACTTACCGTTCCCTCATGTTACGTTCCAGAGGTGTTTCGGGAGGGTGGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTT
 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K>
 351
 _____FCAC1 (A)_____>

>A>C_A_ALOTIPO

>G>T_A_ALOTIPO

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
 TCCCGTCGGGGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCTTGGTCCAGTCCGACTCGA
 G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T>
 377
 _____FCAC1 (A)_____>

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
 CGGACCAGTTTCCGAAGATAGGGTGGCTGTAGCGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTCGGCCTCTTGTGTGATGTTCTGG
 C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T>
 404
 _____FCAC1 (A)_____>

>T>C

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG
 TGCGGAGGGCAGCAGCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATATCGTTCGAGTGGCACCTGTTCTCGTCCACCGTCGTCCC
 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G>
 431
 _____FCAC1 (A)_____>

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
 CTTGCAGAAGAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGTATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCAT
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G>
 457
 _____FCAC1 (A)_____>

>NotI_SÍTIO

|1450

AATGAGCGGCCGC

TTACTCGCCGGCG

K *>

458

____->

Fig.22A.

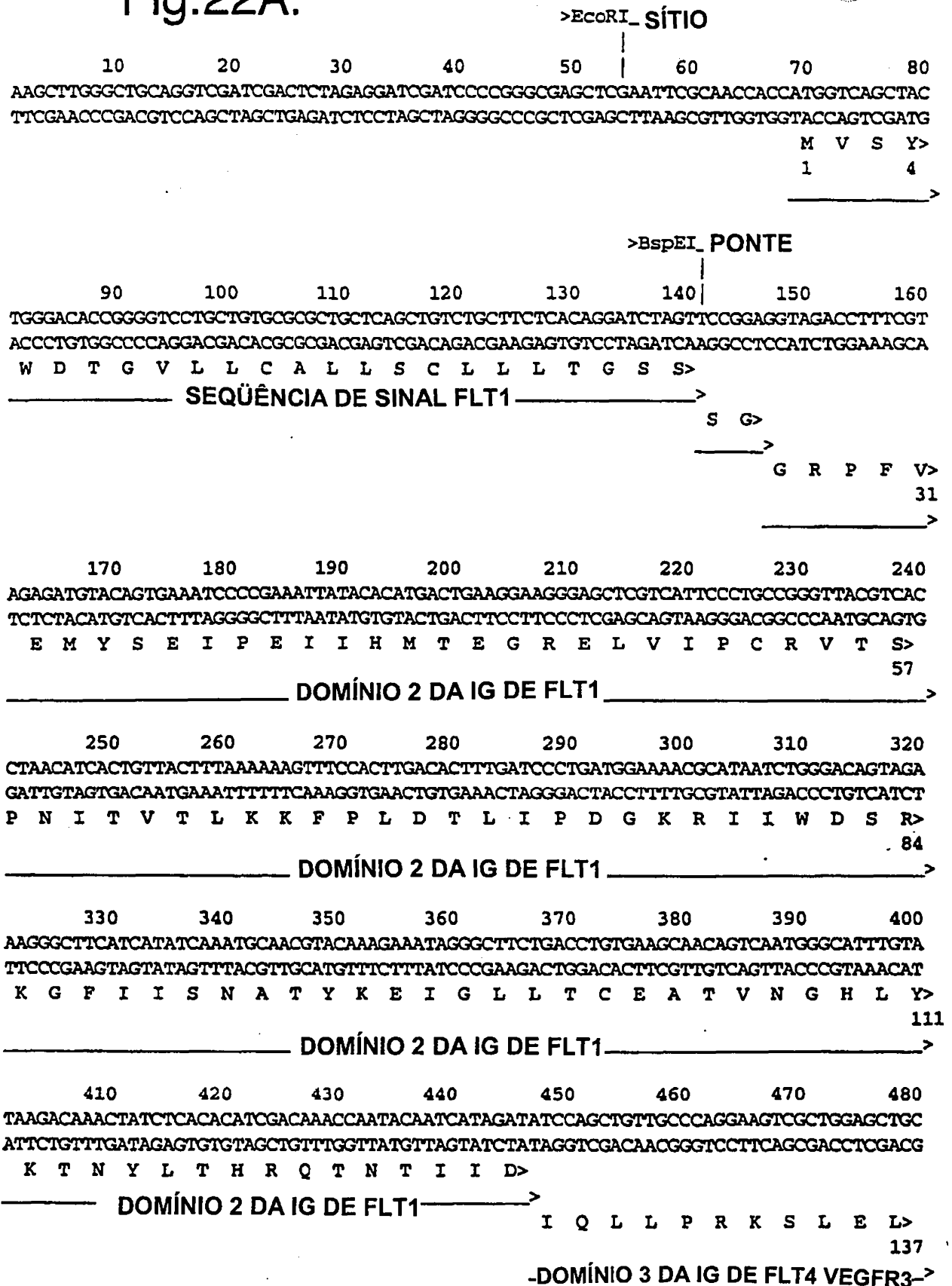


Fig.22B.

490 500 510 520 530 540 550 560
 TGGTAGGGGAGAAGCTGGTCCTCAACTGCACCGTGTGGGCTGAGTTTAACTCAGGTGTCACCTTTGACTGGGACTACCCA
 ACCATCCCCCTCTTCGACCAGGAGTTGACGTGGCACACCCGACTCAAATTGAGTCCACAGTGGAAACTGACCCTGATGGGT
 L V G E K L V L N C T V W A E F N S G V T F D W D Y P>
 164

————— DOMÍNIO 3 DA IG DE FLT4 VEGFR3 —————>

570 580 590 600 610 620 630 640
 GGGAGCAGGCAGAGCGGGGTAAGTGGGTGCCCCGAGCGACGCTCCCAACAGACCCACACAGAACTCTCCAGCATCCTGAC
 CCCTTCGTCCGTCTCGCCCCATTCAACCCACGGGCTCGCTGCGAGGGTTGTCTGGGTGTGTCTTGAGAGGTCGTAGGACTG
 G K Q A E R G K W V P E R R S Q Q T H T E L S S I L T>
 191

————— DOMÍNIO 3 DA IG DE FLT4 VEGFR3 —————>

650 660 670 680 690 700 710 720
 CATCCACAACGTCAGCCAGCACGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACACGGCATCCAGCGATTTCGGGAGAGCA
 GTAGGTGTGTCAGTCGGTCTGTCTGGACCCGAGCATAACACAGTTCCGGTTGTTGCCGTAGGTGCTAAAGCCCTCTCGT
 I H N V S Q H D L G S Y V C K A N N G I Q R F R E S>
 217

————— DOMÍNIO 3 DA IG DE FLT4 VEGFR3 —————>

730 740 750 760 770 780 790 800
 CCGAGGTCATTGTGCATGAAAATGGCCCGGGCGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCGAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGCTCCAGTAACACGTACTTTTACCGGGCCCGCTGTTTGTAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCGTGGACTTGAGGACCCC
 T E V I V H E N>
 ——— VEGFR3 (FLT4) IG ———>

G P G>

—————> D K T H T C P P C P A P E L L G>

244

————— FCAC1 - A ALOTIPO —————>

810 820 830 840 850 860 870 880
 GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT
 CCTGGCAGTCAGAAGGAGAAGGGGGGTTTGGGTTCCTGTGGGAGTACTAGAGGGCCTGGGGACTCCAGTGTACGCACCA
 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V>
 271

————— FCAC1 - A ALOTIPO —————>

890 900 910 920 930 940 950 960
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
 CCACCTGCACTCGGTGCTTCTGGGACTCCAGTTCAAGTTGACCATGCACCTGCCGCACCTCCACGTATTACGGTTCTGTT
 V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
 297

————— FCAC1 - A ALOTIPO —————>

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCCTCACCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGGC
 TCGGCGCCCTCCTCGTCATGTTGTCTGTCATGGCACACCAAGTCCGAGGAGTGGCAGGACGTGGTCTTGACCGACTTACCG
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G>
 324

————— FCAC1 - A ALOTIPO —————>

Fig.22C.

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 TTCCTCATGTTACAGTTCAGAGGTGTTTCGGGAGGGTCGGGGTAGCTCTTTTGGTAGAGGTTTCGGTTTCCCGTCGG
 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P>
 351

FCAC1 - A ALOTIPO

>A>C_A ALOTIPO

>G>T_A ALOTIPO

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCGCTGGTCA
 GGCTCTTGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGCCCTACTCGACTGGTTCCTGGTCCAGTCCGACTGGACGGACCACT
 R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V>
 377

FCAC1 - A ALOTIPO

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
 TTCCGAAGATAGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACCTCTCGTTACCCGTCGGCCTCTTGTGATGTTCTGGTGGGAGGG
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P>
 404

FCAC1 - A ALOTIPO

>T>C

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CACGACCTGAGGCTGCCGAGGAAGAAGGAGATATCGTTCGAGTGGCACCTGTCTCTCGTCCACCGTCGTCCTTGCAGAA
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F>
 431

FCAC1 - A ALOTIPO

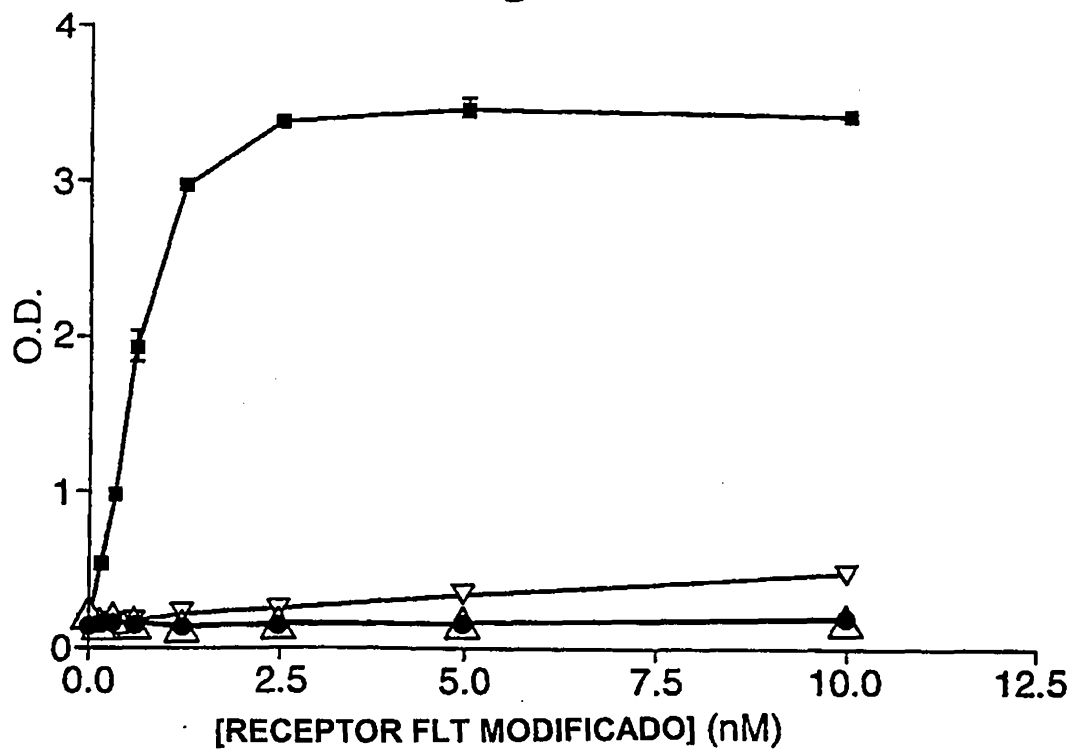
>Not I. SÍTIO

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGG
 GAGTACGAGGCACTACGTACTCCGAGACGTGTTGGTGTATGTGCGTCTTCTCGGAGAGGGACAGAGGCCCATTTACTCGCC
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *>
 455

FCAC1 - A ALOTIPO

CCGC
 GGCG

Fig.23.



- Flt1D2Flk1D3.FcdeltaC1(a)
- △ Flt1D2VEGFR3D3.FcdeltaC1(a)
- ▽ TIE2-Fc
- Flt1(1-3)-Fc

Fig.24A.

10 20 30 40 50 60
 * * * * * *
 ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
 TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG CGC GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
 M V S Y W D T G V L L C A L L S C L L L>
 1 _____ 5 _____ **SEQÜÊNCIA DE SINAL hFLT1** _____ 15 _____ 20>

70 80 90 100 110 120
 * * * * * *
 ACA GGA TCT AGT TCC GGA AGT GAT ACC GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC
 TGT OCT AGA TCA AGG CCT TCA CTA TGG OCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG
 T G S S S G>
 21_hFLT1 SIGNAL SEQ_26>

S D T G R P F V E M Y S E I>
 27 _____ 30 _____ **DOMÍNIO 2 DA IG DE hFLT1** _____ 40>

130 140 150 160 170 180
 * * * * * *
 CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA
 GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT
 P E I I H M T E G R E L V I P C R V T S>
 41 _____ 45 _____ **DOMÍNIO 2 DA IG DE hFLT1** _____ 55 _____ 60>

190 200 210 220 230 240
 * * * * * *
 CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC OCT GAT GGA AAA
 GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA OCT TTT
 P N I T V T L K K F P L D T L I P D G K>
 61 _____ 65 _____ **DOMÍNIO 2 DA IG DE hFLT1** _____ 75 _____ 80>

250 260 270 280 290 300
 * * * * * *
 CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA
 GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CGG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT
 R I I W D S R K G F I I S N A T Y K E I>
 81 _____ 85 _____ **DOMÍNIO 2 DA IG DE hFLT1** _____ 95 _____ 100>

310 320 330 340 350 360
 * * * * * *
 GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA
 CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT
 G L L T C E A T V N G H L Y K T N Y L T>
 101 _____ 105 _____ **DOMÍNIO 2 DA IG DE hFLT1** _____ 115 _____ 120>

370 380 390 400 410 420
 * * * * * *
 CAT CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTG GTT CTG AGT CCG TCT CAT GGA ATT GAA CTA
 GTA GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAC CAA GAC TCA GGC AGA GTA CCT TAA CTT GAT
 H R Q T N T I I D>
 121 _____ **DOMÍNIO 2 DA IG** _____ 129>
 DE hFLT1

V V L S P S H G I E L>
 130 _____ **DOMÍNIO 3 DA IG** _____ 140>
 DE hFLK1

Fig.24B.

430 440 450 460 470 480
 * * * * * *
 TCT GTT GGA GAA AAG CTT GTC TTA AAT TGT ACA GCA AGA ACT GAA CTA AAT GTG GGG ATT
 AGA CAA CCT CTT TTC GAA CAG AAT TTA ACA TGT CGT TCT TGA CTT GAT TTA CAC CCC TAA
 S V G E K L V L N C T A R T E L N V G I>
 141_____145_____ **DOMÍNIO 3 DA IG DE hFLK1** _____155_____160>

490 500 510 520 530 540
 * * * * * *
 GAC TTC AAC TGG GAA TAC CCT TCT TCG AAG CAT CAG CAT AAG AAA CTT GTA AAC CGA GAC
 CTG AAG TTG ACC CTT ATG GGA AGA AGC TTC GTA GTC GTA TTC TTT GAA CAT TTG GCT CTG
 D F N W E Y P S S K H Q H K K L V N R D>
 161_____165_____ **DOMÍNIO 3 DA IG DE hFLK1** _____175_____180>

550 560 570 580 590 600
 * * * * * *
 CTA AAA ACC CAG TCT GGG AGT GAG ATG AAG AAA TTT TTG AGC ACC TTA ACT ATA GAT GGT
 GAT TTT TGG GTC AGA CCC TCA CTC TAC TTC TTT AAA AAC TCG TGG AAT TGA TAT CTA CCA
 L K T Q S G S E M K K F L S T L T I D G>
 181_____185_____ **DOMÍNIO 3 DA IG DE hFLK1** _____195_____200>

610 620 630 640 650 660
 * * * * * *
 GTA ACC CGG AGT GAC CAA GGA TTG TAC ACC TGT GCA GCA TCC AGT GGG CTG ATG ACC AAG
 CAT TGG GCC TCA CTG GTT CCT AAC ATG TGG ACA CGT CGT AGG TCA CCC GAC TAC TGG TTC
 V T R S D Q G L Y T C A A S S G L M T K>
 201_____205_____ **DOMÍNIO 3 DA IG DE hFLK1** _____215_____220>

670 680 690 700 710 720
 * * * * * *
 AAG AAC AGC ACA TTT GTC AGG GTC CAT GAA AAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
 TTC TTG TCG TGT AAA CAG TCC CAG GTA CTT TTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG
 K N S T F V R V H E K>
 221_____ **DOMÍNIO 3 DA IG DE hFLK1** _____231>

D K T H T C P P C>
 232_____hFCAC1 A _____240>

730 740 750 760 770 780
 * * * * * *
 CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
 GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG
 P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D>
 241_____245_____hFCAC1 A _____255_____260>

790 800 810 820 830 840
 * * * * * *
 ACC CTC ATG ATC TCC CCG AOC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
 TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT
 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E>
 261_____265_____hFCAC1 A _____275_____280>

850 860 870 880 890 900
 * * * * * *
 GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
 CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT
 D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T>
 281_____285_____hFCAC1 A _____295_____300>

Fig.24C.

```

          910          920          930          940          950          960
          *          *          *          *          *          *
AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG
TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TGG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC
K  P  R  E  E  Q  Y  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L>
301_____305_____hFCAC1 A _____315_____320>

          970          980          990          1000          1010          1020
          *          *          *          *          *          *
CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT
H  Q  D  W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  A  L  P>
321_____325_____hFCAC1 A _____335_____340>

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
          *          *          *          *          *          *
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC
CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG
A  P  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y>
341_____345_____hFCAC1 A _____355_____360>

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
          *          *          *          *          *          *
ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTA CTC GAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG
T  L  P  P  S  R  D  E  L  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V>
361_____365_____hFCAC1 A _____375_____380>

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
          *          *          *          *          *          *
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG
K  G  F  Y  P  S  D  I  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N>
381_____385_____hFCAC1 A _____395_____400>

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
          *          *          *          *          *          *
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC
N  Y  K  T  T  P  P  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  K>
401_____405_____hFCAC1 A _____415_____420>

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
          *          *          *          *          *          *
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA
L  T  V  D  K  S  R  W  Q  Q  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H>
421_____425_____hFCAC1 A _____435_____440>

          1330          1340          1350          1360          1370
          *          *          *          *          *
GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
E  A  L  H  N  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  P  G  K  *>
441_____445_____hFCAC1 A _____455_____458>

```

P 10011407

Fig.25A.

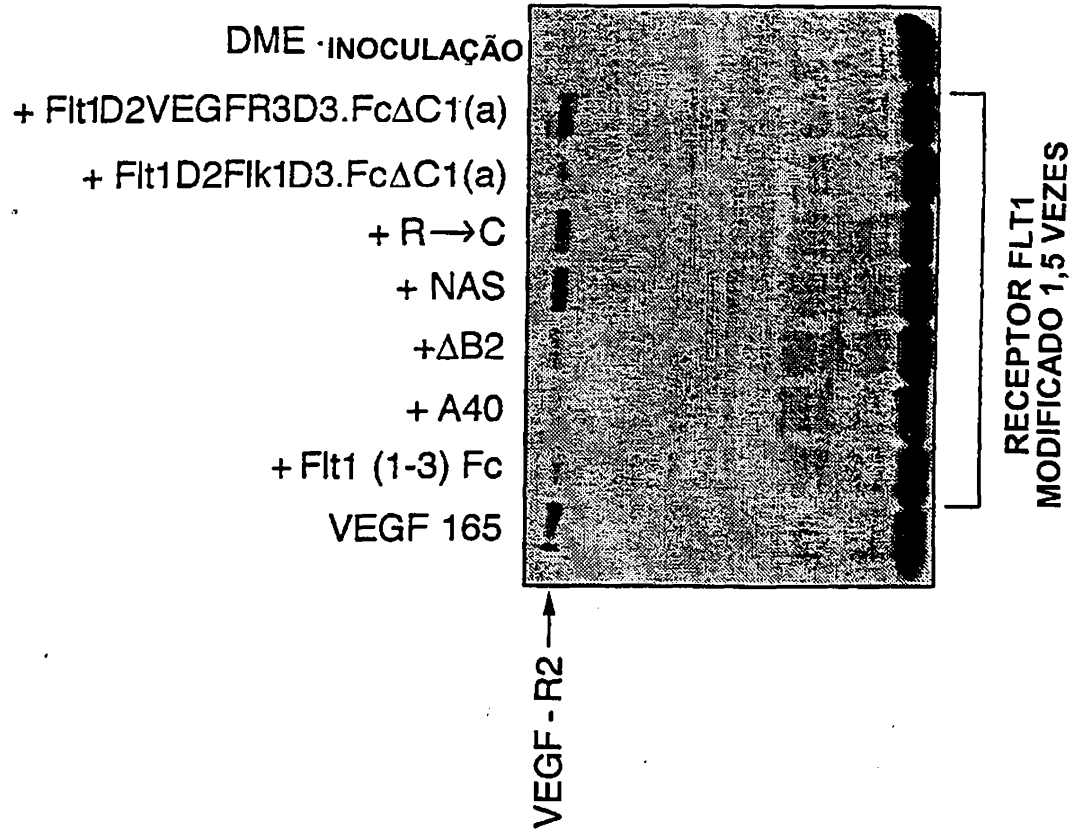
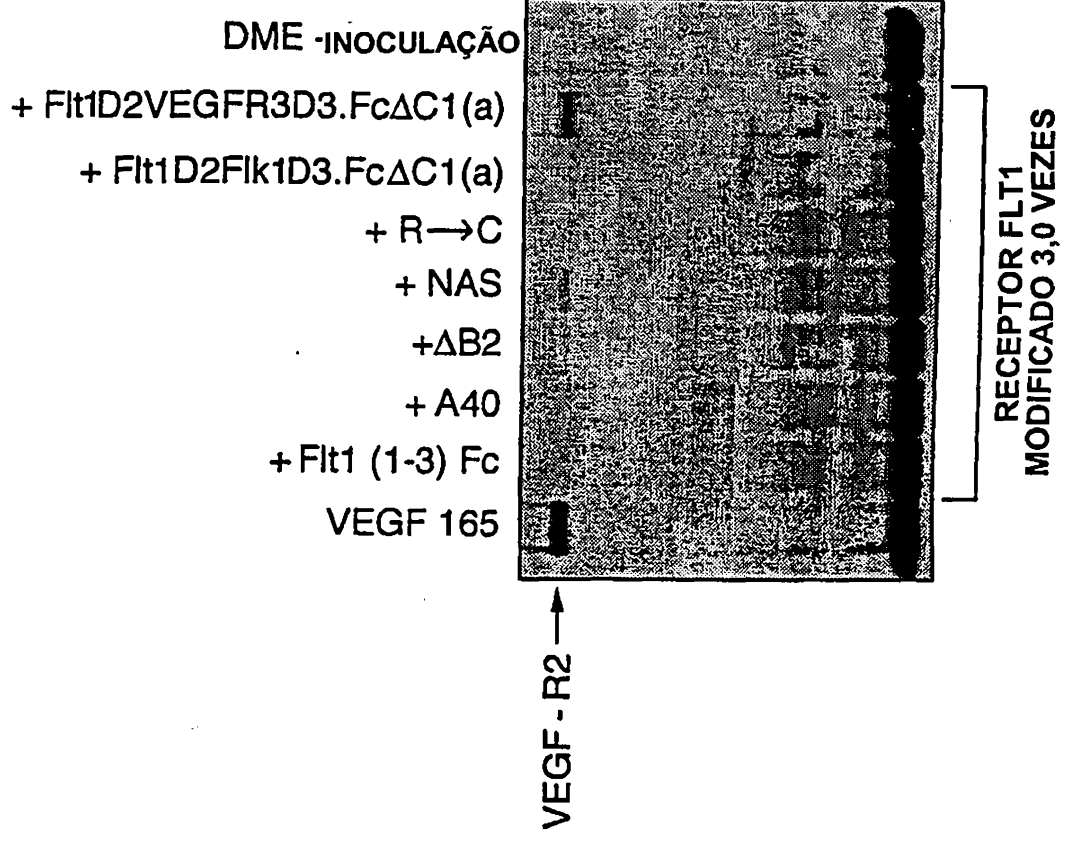
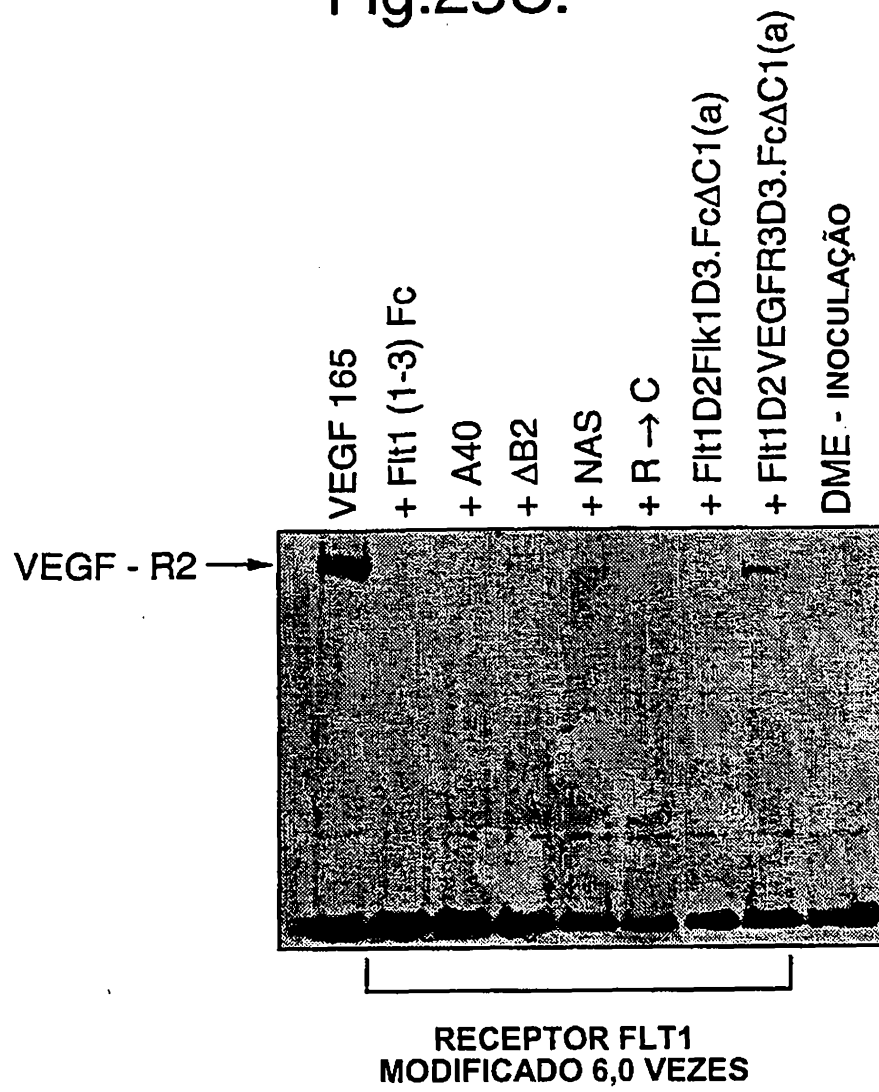


Fig.25B.



P 10011407

Fig.25C.



P10011407

Fig.26A.

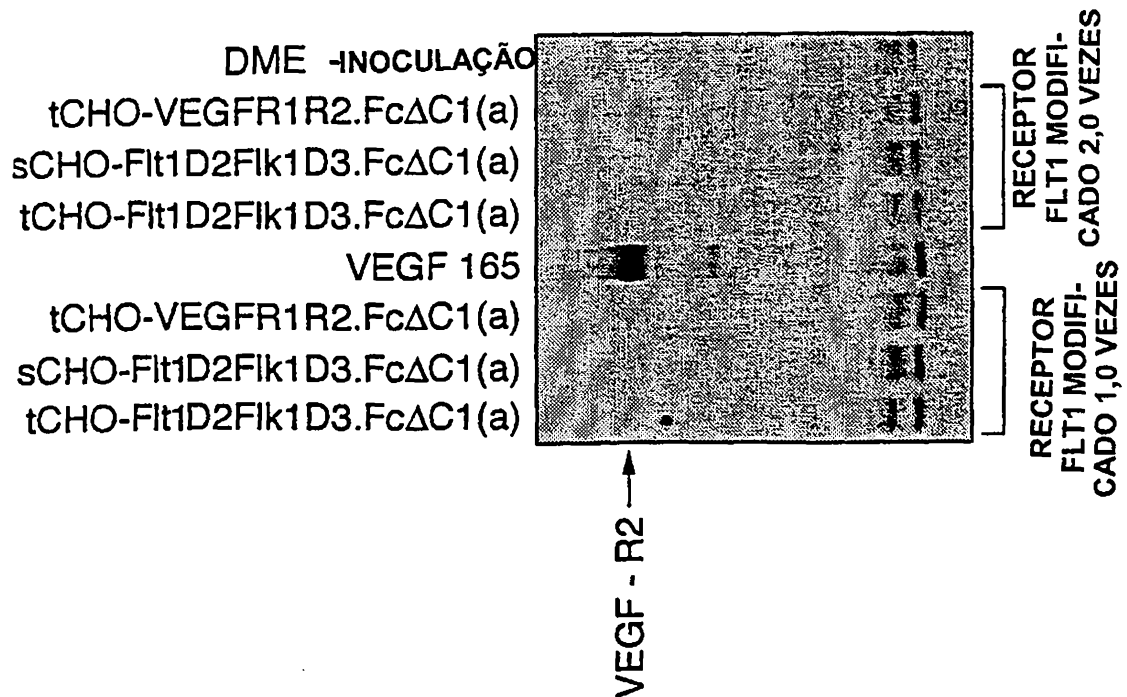
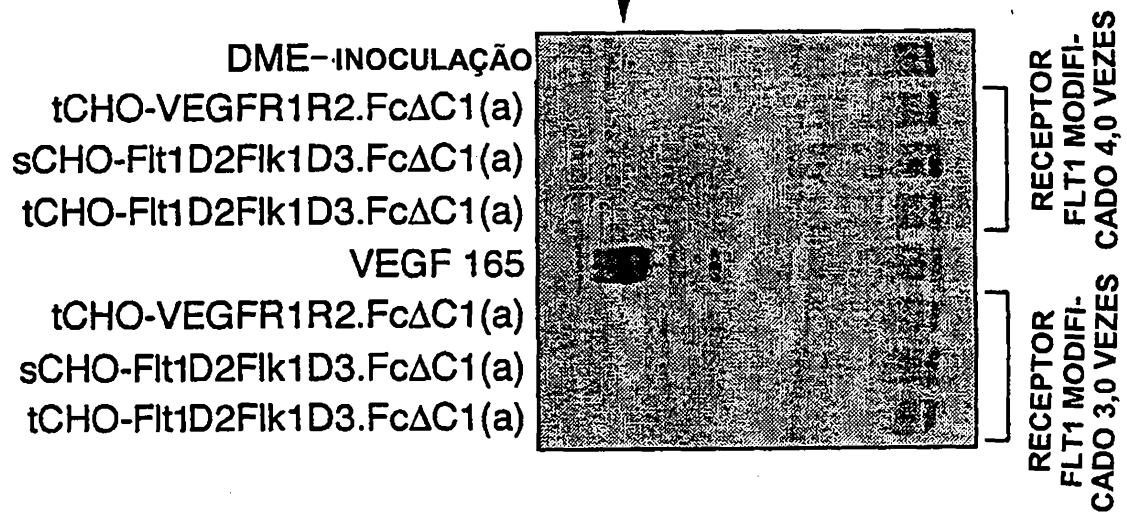


Fig.26B.



P10011407

Fig.27.

- FIt1D2FIk1D3.FcdeltaC1(a)
- FIt1D2VEGFR3D3.FcdeltaC1(a)
- ◆ FIt1(1-3)-Fc
- ▲ Tie2-Fc

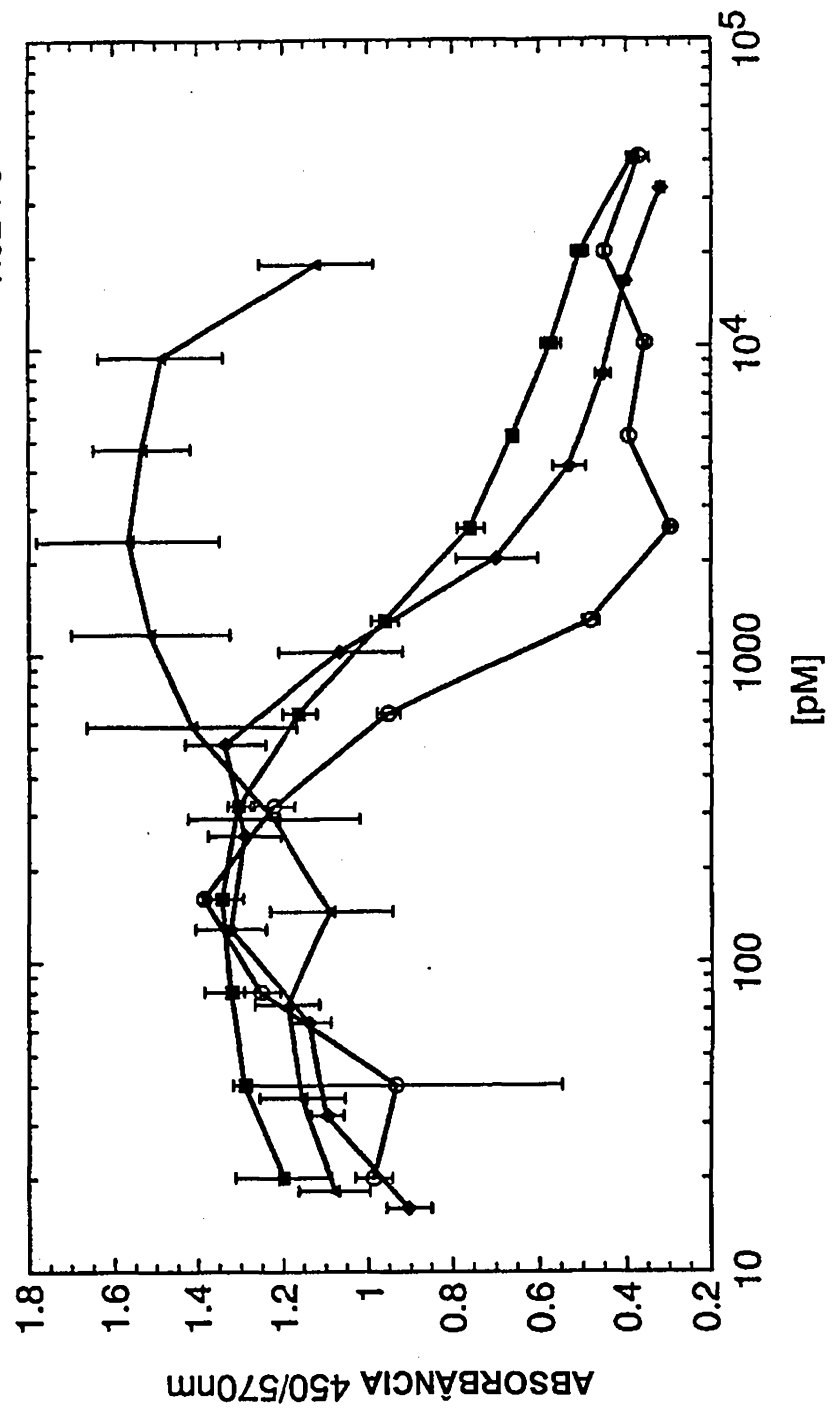


Fig.28.

ESTEQUIOMETRIA DE LIGAÇÃO DE HVEGF165 AO FLT1D2FLK1D3.FcΔC1(A) & VEGFR1R2-FcΔC1(A)		
hVEGF165 (nM)	VEGF/Flt1D2Flk1D3.FcΔC1(a)	VEGF/VEGFR1R2-FcΔC1(a)
1	0.93	0.98
10	0.97	0.94
50	1	0.99
MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.02

P10011407

Fig.29.

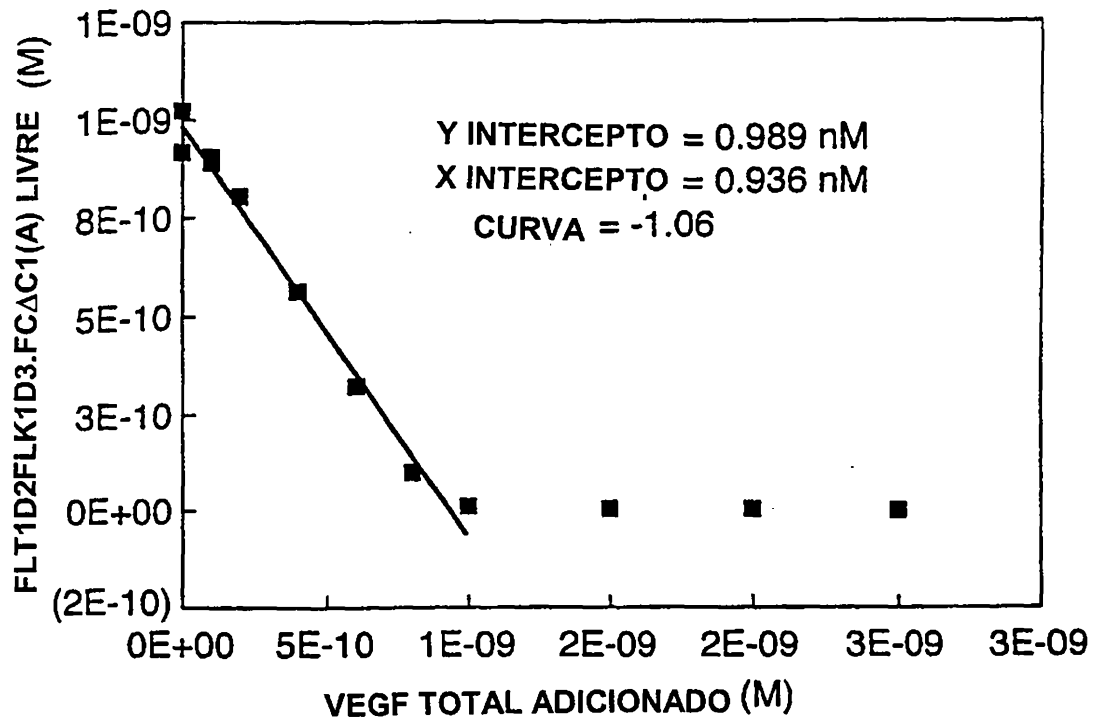
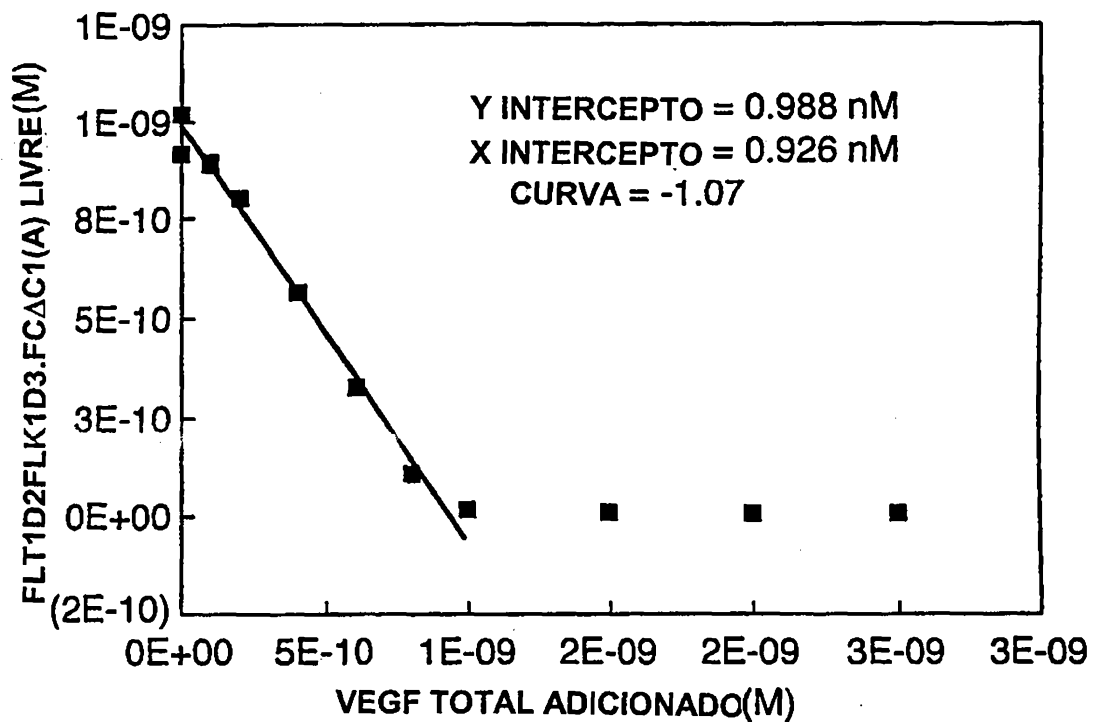
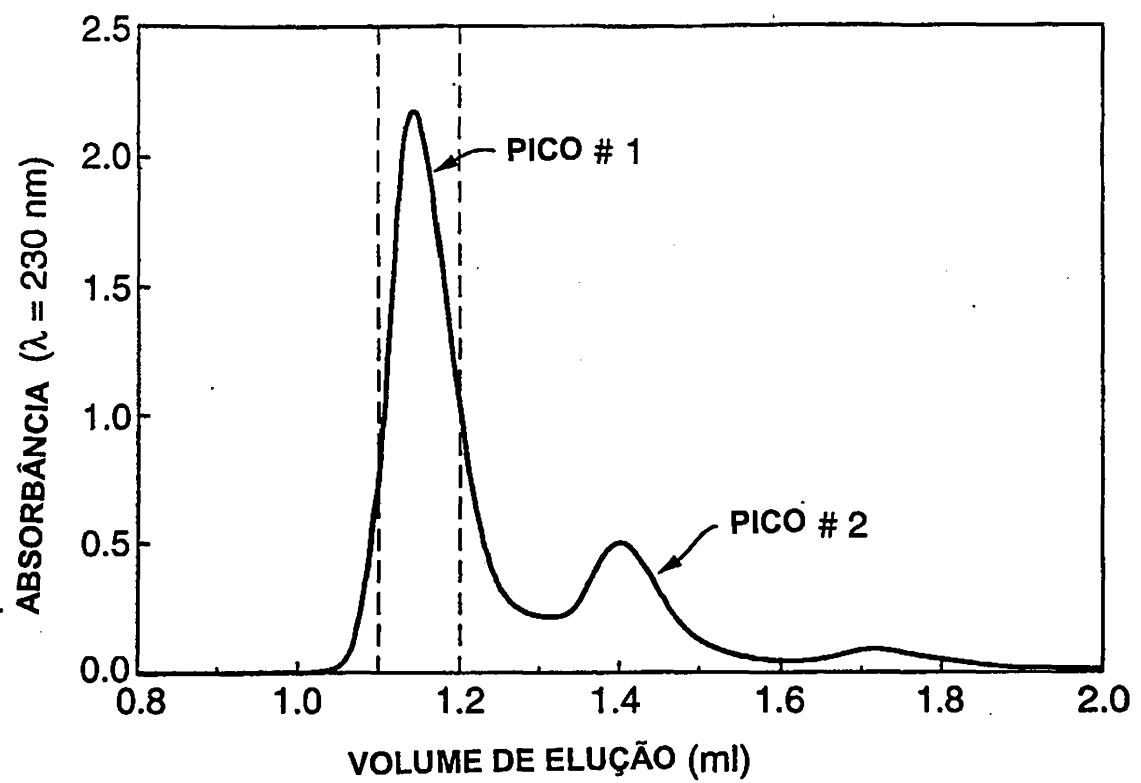


Fig.30.



P10011407

Fig.31.



P10011407

Fig.32.

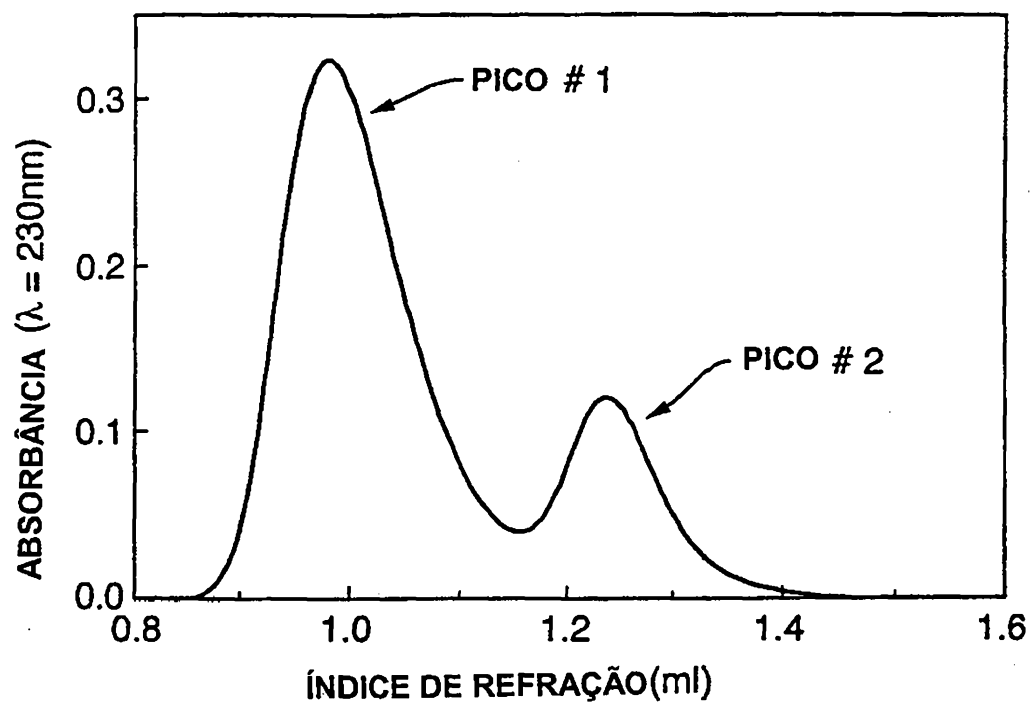
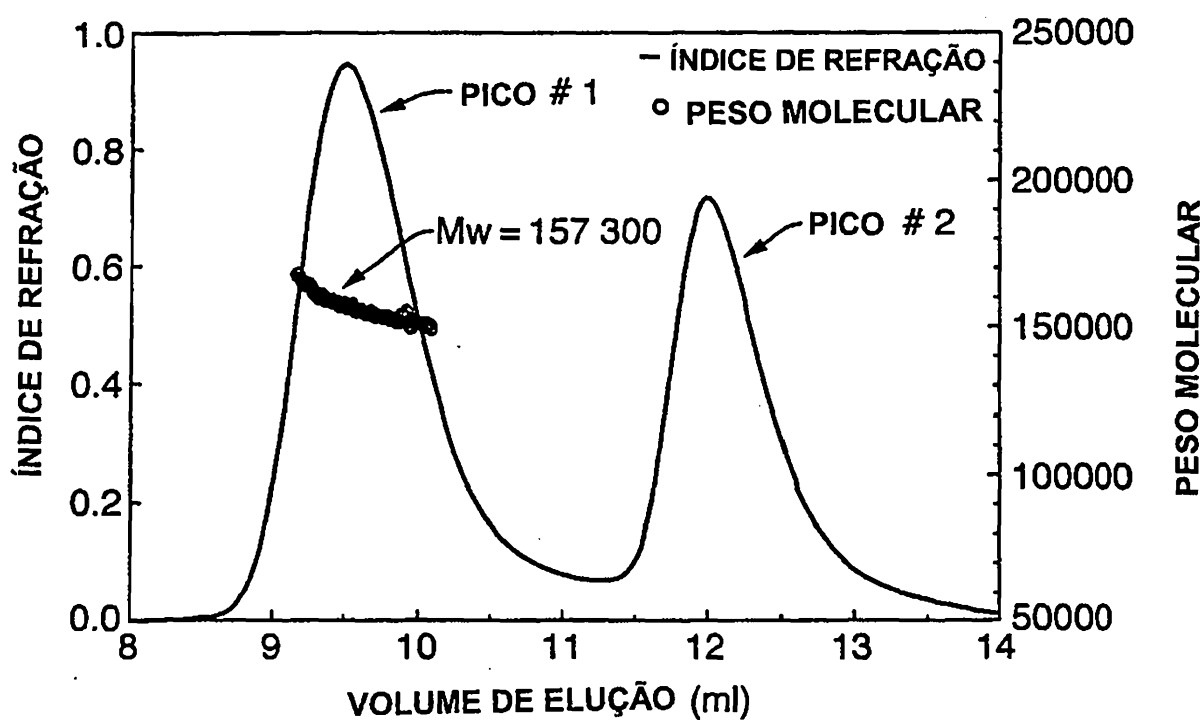


Fig.33.



P10011407

Fig.34.

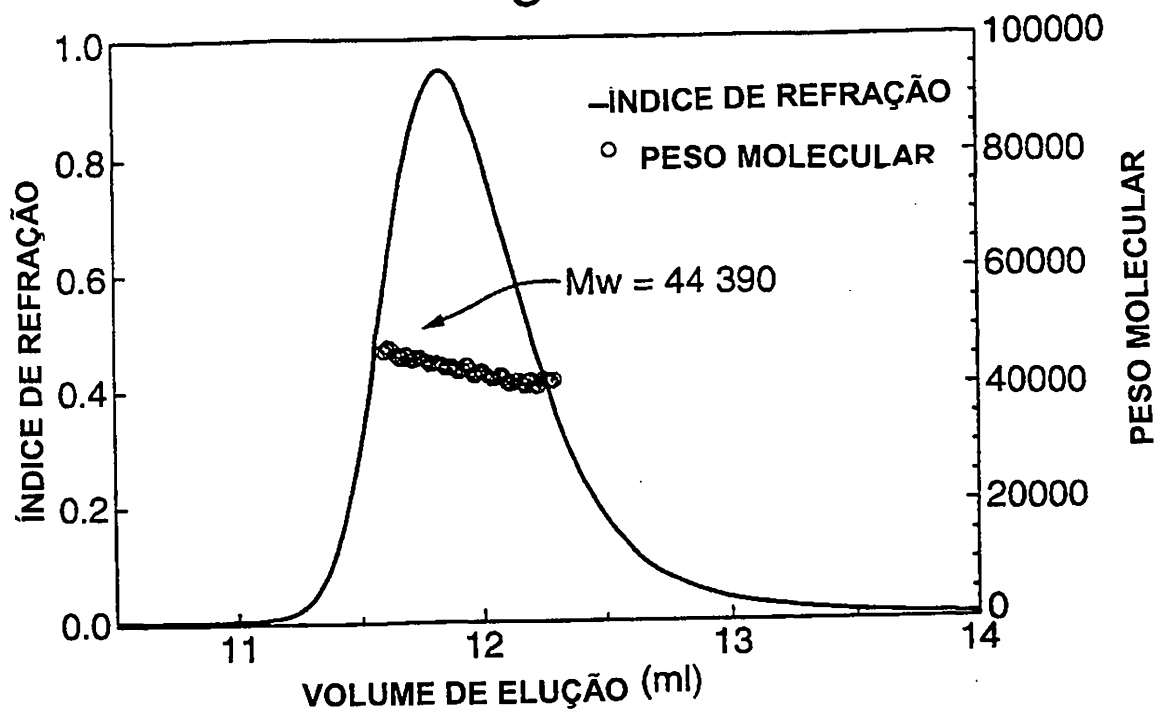


Fig.35.

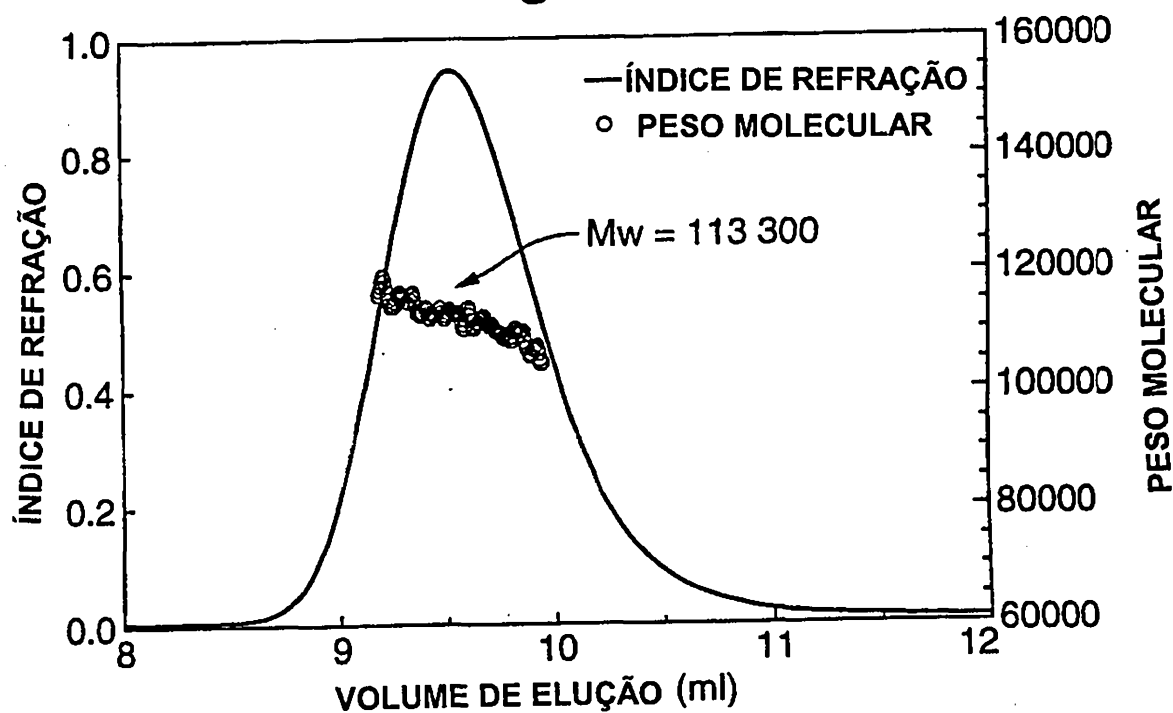


Fig.36.

GRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDG 50
KRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHL YKTNYLTHRQTNTIUD 100
VVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNR 150
DLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVH 200
EKGPGDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD 250
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN 300
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL 350
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS 400
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

52/55

P10011407

Fig.37.

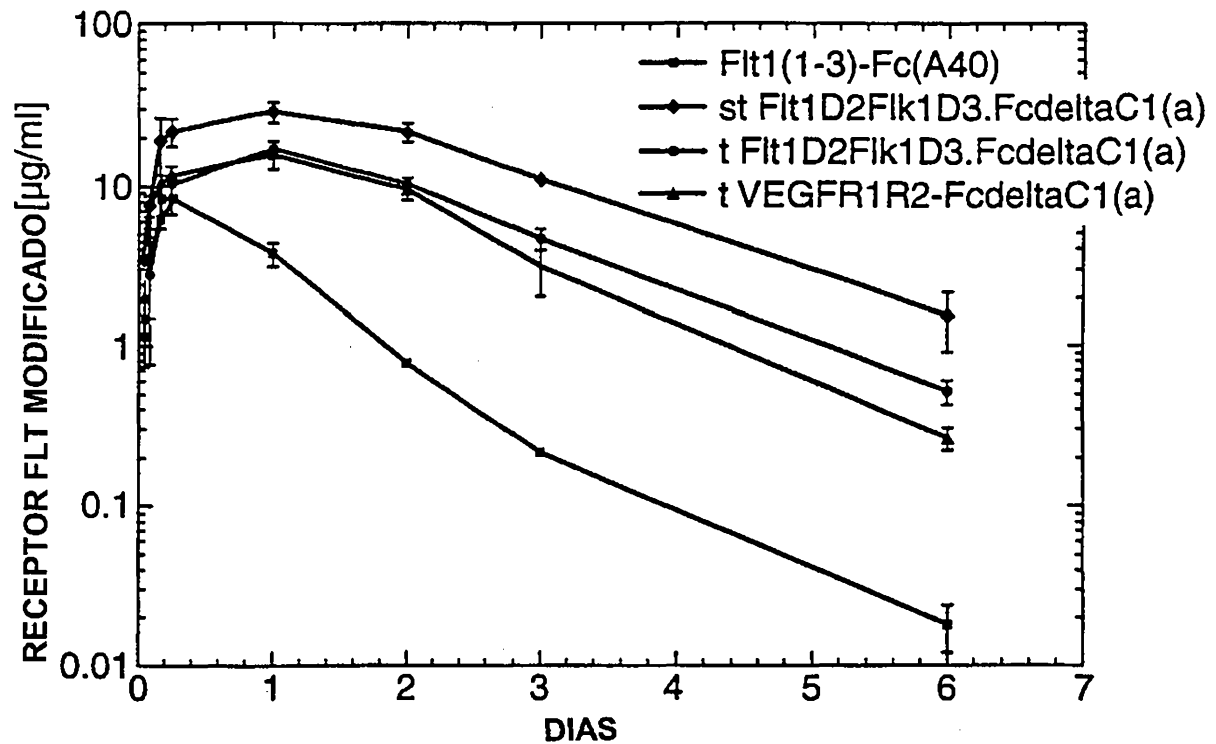
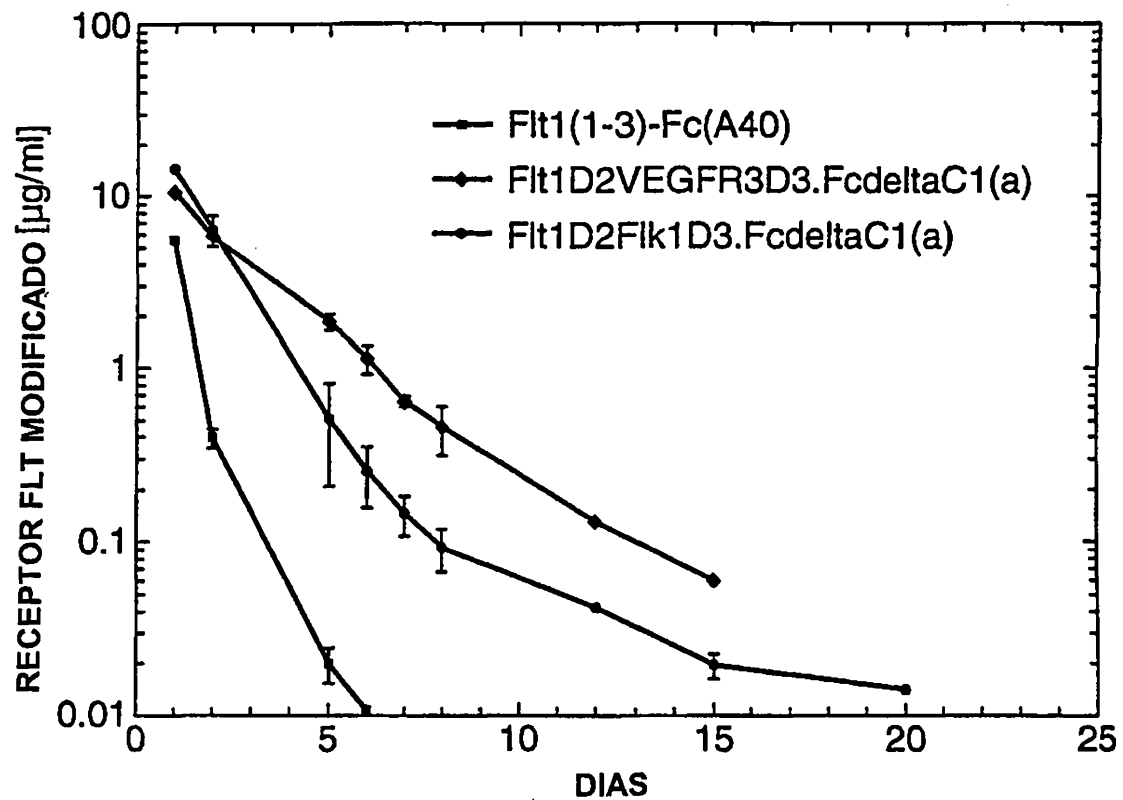


Fig.38.



P. 000.000

Fig.39.

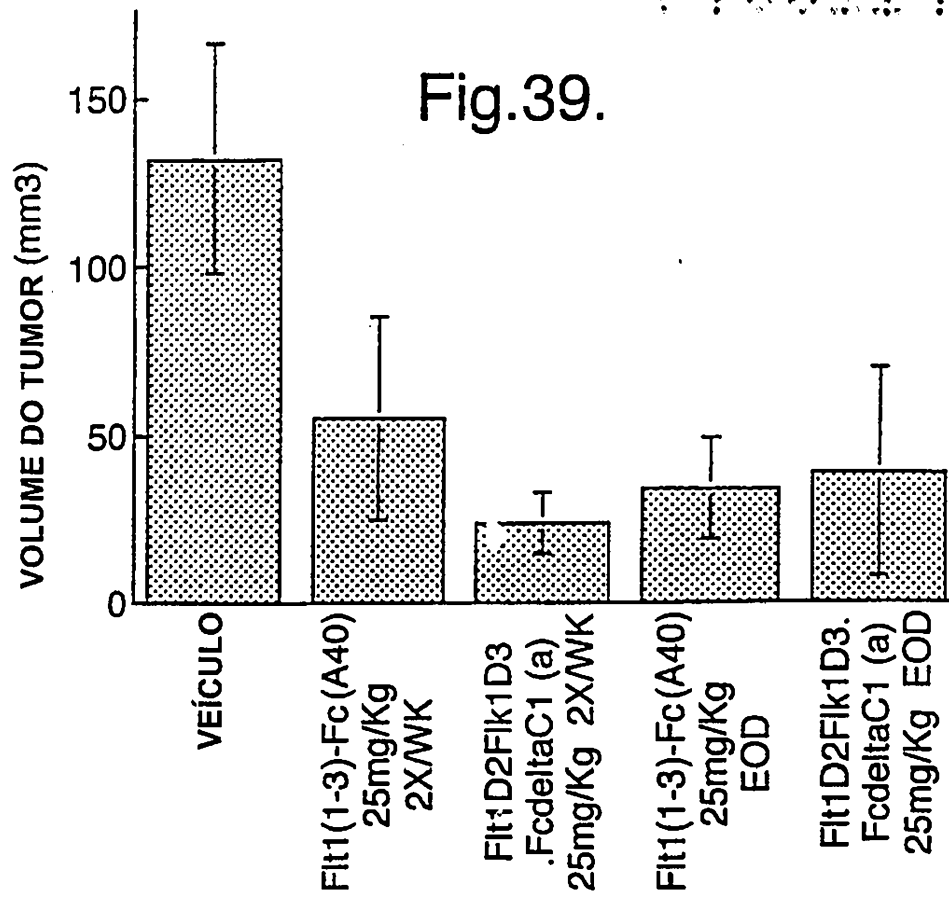
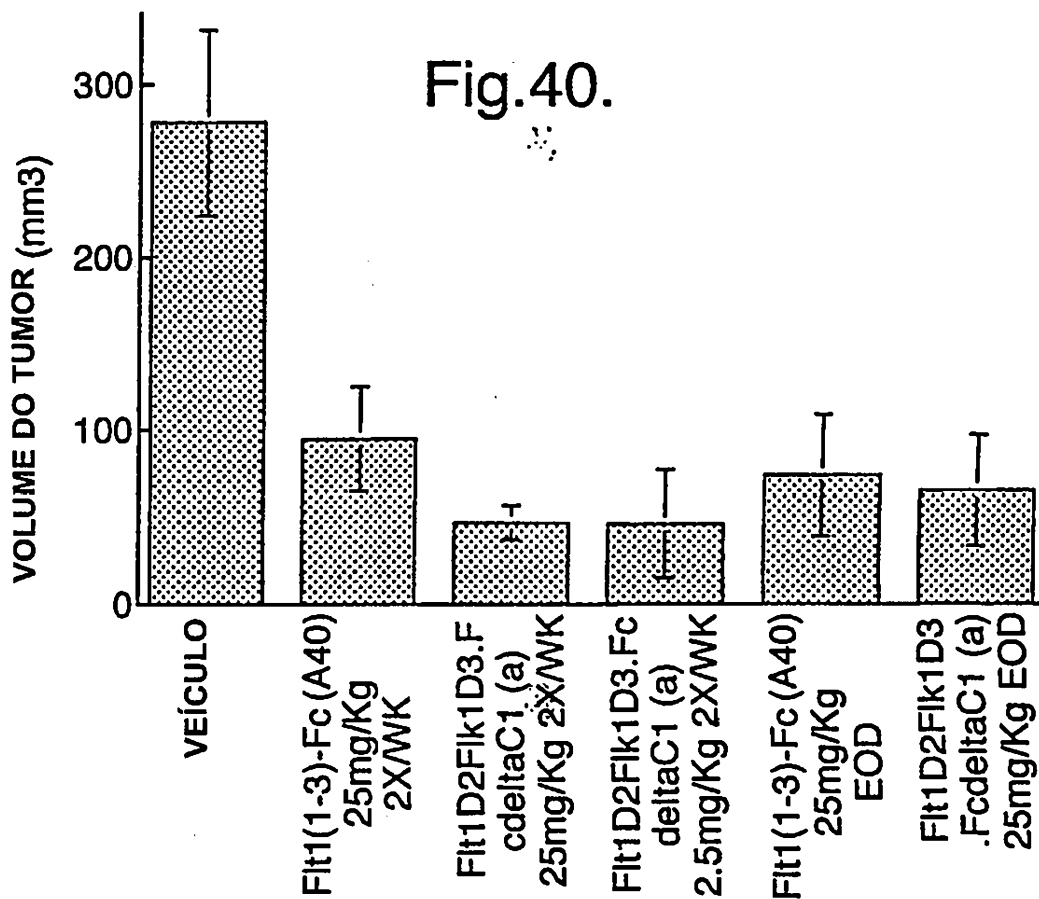
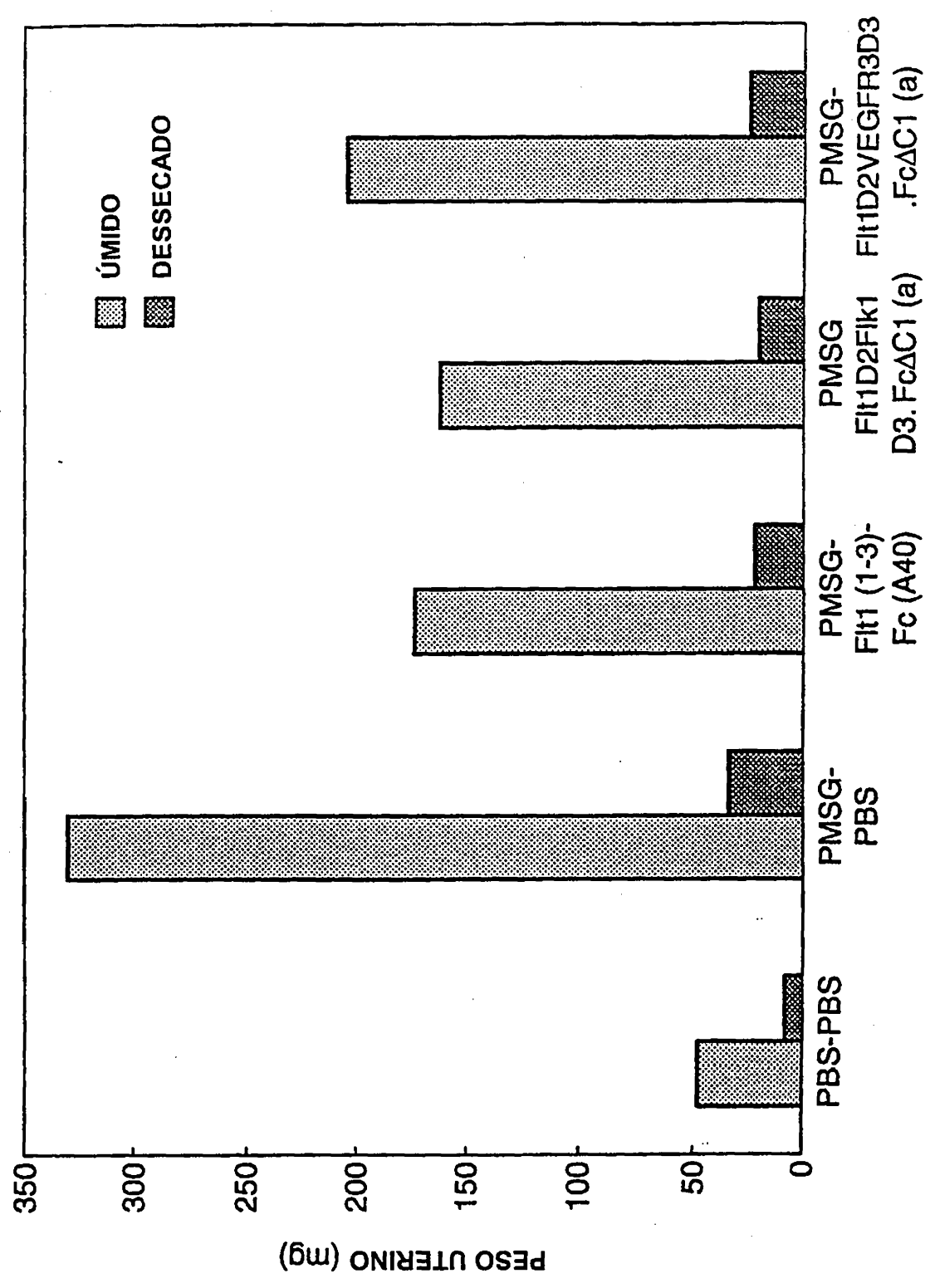


Fig.40.



Printed on 11/11/03

Fig.41.



P10011407

Fig.42A.

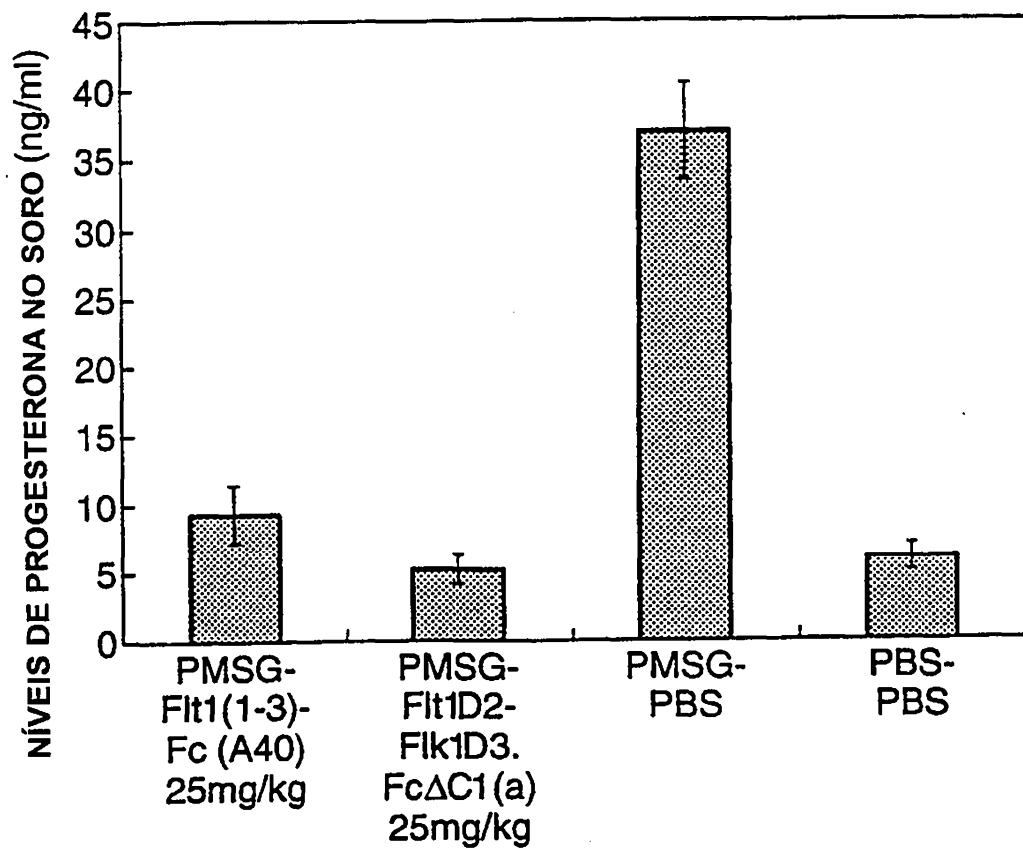


Fig.42B.

