

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.09.06**

(30) Prioridade(s): **2005.09.07 US 71529205 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2012.05.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.07.15**
197/2015

(73) Titular(es):

PFIZER INC
235 EAST 42ND STREET NEW YORK, NY 10017
US
AMGEN FREMONT INC.
US

(72) Inventor(es):

SIRID-AIMEE KELLERMANN **US**
MICHAEL AIDAN NORTH **US**
VAHE BEDIAN **US**
SHELLEY SIMS BELOUSKI **US**
DANA DAN HU-LOWE **US**

(74) Mandatário:

MARIA TERESA DELGADO
AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA CINASE-1 TIPO RECETOR DE ACTIVINA (ALK-1)**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE AOS ANTICORPOS INCLUINDO ANTICORPOS HUMANOS E PORÇÕES DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO DOS MESMOS QUE SE LIGAM AO DOMÍNIO EXTRACELULAR (DEC) DA CINASE-1 TIPO RECETOR DE ACTIVINA (ALK-1) E QUE FUNCIONAM PARA ANULAR A VIA DE SINALIZAÇÃO DE ALK-1/TGF-BETA-1/SMAD1. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE ÀS IMUNOGLOBULINAS DE CADEIA PESADA E LEVE DERIVADAS DE ANTICORPOS ANTI-ALK-1 HUMANOS E MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM TAIS IMUNOGLOBULINAS. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE AOS MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ALK-1 HUMANOS, COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM ESTES ANTICORPOS E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS E COMPOSIÇÕES. A INVENÇÃO TAMBÉM E REFERE AOS ANIMAIS OU PLANTAS TRANSGÉNICAS QUE COMPREENDEM MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DA PRESENTE DIVULGAÇÃO.

RESUMO**"ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA CINASE-1 TIPO RECETOR DE ACTIVINA (ALK-1) "**

A presente invenção refere-se aos anticorpos incluindo anticorpos humanos e porções de ligação a antigénio dos mesmos que se ligam ao domínio extracelular (DEC) da cinase-1 tipo recetor de activina (ALK-1) e que funcionam para anular a via de sinalização de ALK-1/TGF-beta-1/Smad1. A invenção também se refere às imunoglobulinas de cadeia pesada e leve derivadas de anticorpos anti-ALK-1 humanos e moléculas de ácido nucleico que codificam tais imunoglobulinas. A presente invenção também se refere aos métodos de produção de anticorpos anti-ALK-1 humanos, composições que compreendem estes anticorpos e métodos de utilização dos anticorpos e composições. A invenção também se refere aos animais ou plantas transgénicas que compreendem moléculas de ácido nucleico da presente divulgação.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS PARA CINASE-1 TIPO RECETOR DE ACTIVINA (ALK-1)"

Campo da invenção

A presente divulgação refere-se aos anticorpos monoclonais humanos e porções de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam ao domínio extracelular (DEC), da cinase-1 tipo recetor de activina (ALK-1). A divulgação refere-se igualmente às moléculas de ácido nucleico que codificam tais anticorpos e porções de ligação a antígeno, métodos de produção de anticorpos anti-ALK-1 humanos e porções de ligação a antígeno, composições que compreendem estes anticorpos e porções de ligação a antígeno e métodos de utilização dos anticorpos, porções de ligação a antígeno, e composições.

Antecedentes da invenção

A ALK-1 é um recetor da superfície celular tipo I para transformar o recetor beta do fator de crescimento tipo 1 (TGF-beta-1). A ALK-1 humana é um polipéptido de 503 aminoácidos, que inclui uma sequência sinal (aminoácidos: 1-21), um domínio de ligação ao ligando TGF-beta-1 extracelular N-terminal ou DEC (aminoácidos: 22-118), um domínio transmembranar único (aminoácidos: 119-141), um domínio regulador rico em glicina/serina (GS) (aminoácidos: 142-202) e um domínio de serina-treonina cinase C-terminal (202-492). A sequência de aminoácidos de ALK-1 humana revelada em Attisano *et al.* Cell, 1993, vol. 75, pp. 671-680 inclui Ser na posição 172 (registo do GenBank L17075), enquanto a Patente US Nº 6.316.217 reivindica a sequência de aminoácidos de ALK-1 humana com Thr na posição 172 (registo do GenBank NM_000020). O gene ACVRL1 que codifica uma ALK-1 humana de comprimento total revelado em Attisano *et al.* está disponível comercialmente da Invitrogen Inc.,

Clone ID IOH21048. Embora a ALK-1 compartilhe de 60 a 80% de homologia global com outros recetores do tipo I (ALK-2 através de ALK-7), a DEC da ALK-1 é notavelmente divergente dos DCE dos outros membros da família da ALK. Por exemplo, nos seres humanos, apenas o DEC da ALK-2 é significativamente relacionado com o DEC da ALK-1 (partilhando aproximadamente 25% de identidade de aminoácido). A Patente US N° 6.316.217; ten Dijke *et al.* *Oncogene*, 1993, vol. 8, pp. 2879-2887; Attisano *et al.* *Cell*, 1993, vol. 75, pp. 671-680.

Em geral, os ligandos da superfamília de TGF-beta exercem suas atividades biológicas através da ligação aos complexos de recetor heteroméricos de dois tipos (I e II) das serina/treonina cinases. Os recetores do tipo II são constitutivamente cinases ativas que fosforilam o recetor tipo I após a ligação de ligando. Por sua vez, as cinases tipo I ativadas fosforilam a jusante as moléculas sinalizadoras incluindo os diversos Smads, que se deslocam para o núcleo e levam a uma resposta transcripcional. Heldin *et al.* *Nature*, 1997, vol. 390, pp. 465-471. No caso da ALK-1, demonstra-se que o Smad1 é especificamente fosforilado e desloca-se ao núcleo onde diretamente regula a expressão dos genes respondedores Smad1 Id1 e EphB2.

A ALK-1 é expressa alta e seletivamente nas células endoteliais e outros tecidos altamente vascularizados tais como a placenta ou cérebro. Demonstrámos pelo perfil de Affymetrix e a RT-PCR em tempo real em que a expressão da ALK-1 nas células endoteliais altamente excede a expressão dos seus co-receptores de activina do tipo II e endoglin, o seu ligando TGF-beta-1 ou ALK-5. As mutações na ALK-1 estão associadas a telangiectasia hemorrágica na hereditariedade (THH), sugerindo um papel crítico para a ALK-1 no controlo do desenvolvimento ou reparação dos vasos sanguíneos. Abdalla *et al.* *J. Med. Genet.*, 2003, vol. 40, pp. 494-502; Sadick *et al.* *Hematologica/The Hematology J.*,

2005, vol. 90, 818-828. Além disso, dois estudos independentes de ratinhos *knockout* por ALK-1 fornecem a chave *in vivo* da evidência para a função de ALK-1 durante a angiogénese. Oh *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2000, vol. 97, pp. 2626-2631; Urness *et al.* Nature Genetics, 2000, vol. 26, pp. 328-331.

A angiogénese é o processo fisiológico que envolve a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos pré-existentes e/ou células estaminais endoteliais circulantes. Este é um processo normal de crescimento e desenvolvimento, assim como na cicatrização de feridas. No entanto, isto é também uma etapa fundamental na transição de tumores de um estado dormente para um estado maligno. Hanahan e Folkman, Hanahan e Folkman, "Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis," Cell, 86(3):353-364, 1996; Carmeliet, "Angiogenesis in Health and Disease," Nature Medicine, 9(6):653-660, 2003; Bergers e Benjamin, "Tumorigenesis and the Angiogenic Switch," Nature Reviews, 3:401-410, 2003. Em doenças como o cancro, o organismo perde a capacidade de manter a angiogénese equilibrada. Novos vasos sanguíneos alimentam-se dos tecidos doentes, destroem os tecidos normais, e no caso de alguns cancros, os novos vasos podem deixar as células tumorais escaparem para dentro da circulação e alojarem-se em outros órgãos (metástases tumorais). Inibidores da angiogénese, incluindo os anticorpos monoclonais (mAbs), são uma classe muito promissora de fármacos direcionados contra este processo anormal para bloquear ou atrasar o crescimento tumoral.

Além de um papel no crescimento de tumor sólido e metástase, outras condições notáveis com uma componente angiogénica são, por exemplo, artrite, psoríase, degeneração macular relacionada à idade neovascular e retinopatia diabética. Bonnet *et al.* "Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation," Rheumatology, 2005, vol. 44, pp. 7-16; Creamer *et al.* "Angiogenesis in psoriasis,"

Angiogenesis, 2002, vol. 5, pp. 231-236; Clavel *et al.* "Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis," Joint Bone Spine, 2003, vol. 70, pp. 321-326; Anandarajah *et al.* "Pathogenesis of psoriatic arthritis," Curr. Opin. Rheumatol., 2004, vol. 16, pp. 338-343; Ng *et al.* "Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration," Can. J. Ophthalmol., 2005, vol. 40, pp. 352-368; Witmer *et al.* "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease," Progress in Retinal & Eye Research, 2003, vol. 22, pp. 1-29; Adamis *et al.* "Angiogenesis e ophthalmic disease," Angiogenesis, 1999, vol. 3, pp. 9-14.

Espera-se que as terapêuticas antiangiogénicas sejam de natureza crónica. Consequentemente, alvos com função endotelial altamente seletiva, tais como a ALK-1, são preferidos para reduzir o atrito resultante dos efeitos colaterais. Além disso, tendo em conta a notável divergência da ALK-1 DEC de DCE dos outros membros da família ALK, espera-se que mAb produzidos contra o DEC da ALK-1 humana tenham como alvo seletivo a ALK-1. Com base nestas considerações, é altamente desejável um anticorpo monoclonal contra o domínio extracelular de ALK-1 que possa inibir a dimerização com o recetor tipo II e, por isso, bloquear a fosforilação Smad1 e a resposta transcripcional a jusante.

R&D Systems, Inc. produz e vende um anticorpo monoclonal ALK-1 anti-humano (Cat # MAB370) produzido a partir de um hibridoma resultante da fusão do mieloma de ratinho com as células B obtidas de um ratinho imunizado com domínio extracelular de ALK-1 humano recombinante derivado de NS0 purificado. Demonstrou-se que este anticorpo nem neutraliza a interação entre ALK-1 e TGF-beta-1 nem anula a fosforilação de Smad1. Antissoros de coelho foram gerados contra um péptido sintético correspondente a uma parte da região justamembranar

intracelular da ALK-1 (resíduos de aminoácido 145-166), acoplada a hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH) (Patente US Nº 6.692.925) e contra o domínio extracelular ALK-1 inteiro exceto para a sequência líder (Lux *et al.*, J. Biol. Chem., 1999, vol. 274, pp. 9984-9992). Abdalla *et al* (Humano Mol. Gene., 2000, vol. 9, pp. 1227-1237) relata a geração de um anticorpo policlonal para ALK-1 usando uma construção de vírus de vaccínia recombinante. A R&D Systems, Inc. produz e vende um anticorpo ALK-1 anti-humano policlonal (Cat. # AF370) produzido em caprinos imunizados com domínio extracelular ALK-1 humano recombinante derivado de NSO purificado.

Até o momento, nenhum anticorpo monoclonal completamente humano para o DEC da ALK-1 foi relatado, e ninguém demonstrou a eficácia de qualquer anticorpo monoclonal para o DEC da ALK-1 em anular a via de sinalização de ALK-1/TGF-beta-1/Smad1.

Fernandez-L *et al*, "'Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions", Cardiovascular Research, Volume 68, No.2, Páginas 235-248 (5 de julho de 2005) diz respeito a isolar e caracterizar células endoteliais circulantes a partir de pacientes com HHT e refere-se a MAB370 anti-ALK-1 na "seção Materiais e Métodos" sob os cabeçalhos "Análise por *Western blot*" e "Microscopia imunofluorescente".

Sumário da Invenção

A invenção é conforme definida pelas reivindicações. Aqueles aspetos/instâncias da presente divulgação que constituem a invenção são conforme definidos pelas reivindicações e nas seguintes formas de realização:

E1. Um anticorpo monoclonal anti-ALK-1 neutralizante, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antigénio inter-concorre para se ligar a ALK-1 com um anticorpo compreendendo: um

domínio variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 6 e um domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 8; ou a sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia pesada codificada pela sequência nucleotídica do inserto encontrado no clone depositado sob o número de acesso ATCC PTA-6864 e o domínio variável de cadeia leve codificado pela sequência nucleotídica do inserto encontrado no clone depositado sob o número de acesso ATCC PTA-6865.

E2. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com E1, em que o dito anticorpo compreende: uma cadeia pesada que utiliza uma sequência de linha germinal V_H 4-31 humana; e uma cadeia leve que utiliza uma sequência de linha germinal V_k A27 humana.

E3. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com E2, em que a sequência de aminoácidos da dita cadeia pesada é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência de linha germinal V_H 4-31 humana, e em que a sequência de aminoácidos da dita cadeia leve é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência de linha germinal V_k A27 humana.

E4. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E3, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6.

E5. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E3, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_L que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

E6. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E5, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 e um domínio V_L que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

E7. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E5, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 95% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 e um domínio V_L que é pelo menos 95% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

E8. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E5, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 99% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 e um domínio V_L que é pelo menos 99% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

E9. O anticorpo de acordo com qualquer uma de E1-E8, em que o dito anticorpo é uma molécula de IgG, ou é derivado da mesma.

E10. O anticorpo de acordo com E9, em que o dito anticorpo é uma molécula de IgG1 ou IgG2.

E11. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E10, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno é derivatizado ou ligado a outra molécula.

E12. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com E11, em que a dita molécula é outro anticorpo, um agente de detecção, um marcador, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, um péptido ou uma proteína.

E13. Uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E12; ou uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo

ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E12.

E14. Um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E12, em que cada vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico; ou um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E12, em que o vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico.

E15. Uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E12; uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E12; um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma de E1-E12, em que

cada vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico; ou um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, em que o vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico.

E16. Uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, e um transportador fisiologicamente aceitável.

E17. Utilização do anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12 ou a composição farmacêutica de acordo com E16 para o fabrico de um medicamento.

E18. Um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12 ou uma composição farmacêutica de acordo com E16, para utilização em terapêutica.

E19. Utilização do anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12 ou a composição farmacêutica de acordo com E16 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro, degeneração macular relacionada com a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide num mamífero.

E20. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12 ou a composição farmacêutica de acordo com E16 para utilização no tratamento de cancro, degeneração macular relacionada com a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide

num mamífero.

E21. Utilização de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, ou uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12; para o fabrico de um medicamento.

E22. Uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, ou uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12; para utilização em terapêutica.

E23. Utilização de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, ou uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12; para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro, degeneração macular relacionada com

a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide num mamífero.

E24. Uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia pesada, e uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia leve, de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, ou uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12; para utilização no tratamento de cancro, degeneração macular relacionada com a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide num mamífero.

E25. O anticorpo, porção de ligação a antigénio ou composição farmacêutica de acordo com E20 para utilização no tratamento de cancro, ou a utilização de acordo com E19 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro, em que o cancro é melanoma cutâneo ou intraocular, mesotelioma, carcinoma de células renais cancro da mama, cancro da cabeça e pescoço, um tumor cerebral primário ou secundário, carcinoma do colo do útero, cancro da uretra, cancro prostático, cancro pancreático, cancro testicular, cancro hepatobiliar, cancro dos canais hepáticos, cancro dos canais biliares, cancro colorretal, cancro da bexiga, cancro ovárico, cancro pulmonar, cancro de pulmão de células não pequenas, cancro de pulmão de células pequenas, cancro do cólon, cancro retal, ou cancro da região anal.

E26. Utilização de um anticorpo monoclonal compreendendo uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos de cadeia leve da

SEQ ID NO: 4 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro hepatobiliar num mamífero.

E27. Um anticorpo monoclonal compreendendo uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 4 para utilização no tratamento de cancro hepatobiliar num mamífero.

E28. O anticorpo, porção de ligação a antigénio ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma de E20, E25 e E27, a molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia pesada, e a molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia leve, de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, ou a molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma de E1-E12, para utilização de acordo com E24, ou a utilização de acordo com qualquer uma de E19, E23, E25, e E26; em que o mamífero é um ser humano.

A divulgação pertence aos anticorpos monoclonais anti-ALK-1 de neutralização isolados ou porções de ligação a antigénio dos mesmos que se ligam à ALK-1 de primata, preferivelmente o DEC da ALK-1 de primata, mais preferivelmente o DEC de ALK-1 humano. Numa instância preferida, os anticorpos de neutralização são anticorpos monoclonais completamente humanos ou porções de ligação a antigénio dos mesmos.

Em outro aspeto, a presente divulgação é um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antigénio do mesmo que anula a via de sinalização de ALK-1/TGF-beta-1/Smad1. Numa instância preferida, os anticorpos são anticorpos

monoclonais completamente humanos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos.

Num outro aspeto, a presente divulgação é um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo em que o anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo é um antagonista da angiogénese estimulada por TGF-beta-1. Numa instância preferida, os anticorpos são anticorpos monoclonais completamente humanos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos.

Num outro aspeto, a presente divulgação é um anticorpo anti-ALK-1 completamente humano ou porção de ligação a antígeno em que o anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo é um antagonista da angiogénese tumoral estimulada por TGF-beta-1.

Em outro aspeto, a presente divulgação é um anticorpo anti-ALK-1 completamente humano injetável bem tolerado ou porção de ligação a antígeno do mesmo, cujo anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo é um antagonista da angiogénese estimulada por TGF-beta-1.

Num outro aspeto, a presente divulgação é um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo cujo anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo inibe a regulação positiva de um gene alvo a jusante específico da ALK-1, Id1. Numa instância preferida, os anticorpos são anticorpos monoclonais completamente humanos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos.

Num outro aspeto, a presente divulgação é um anticorpo monoclonal de anti-ALK-1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo em que o anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo é descrito em termos de pelo menos uma das várias propriedades funcionais conforme descrito a seguir.

Por exemplo, numa instância o anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo liga-se ao domínio extracelular da ALK-1 de primata com um valor de avidéz de

1 pM ou menos como medido pela ressonância de plasmão superficial. Numa outra instância, o anticorpo ou a porção liga-se ao domínio extracelular da ALK-1 de primata com um valor de avidéz de menos do que 100 nM, menos do que 5 nM, menos do que 1 nM, menos do que 500 pM, menos do que 100 pM, menos do que 60 pM, menos do que 20 pM, menos do que 10 pM, ou menos do que 1 pM, como medido pela ressonância de plasmão superficial. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 0,1 pM a 1 μ M. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 100 nM. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 5 nM. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 500 pM. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 100 pM. Em outras instâncias, a avidéz é de 1 pm a 10 pm.

Numa outra instância, o anticorpo ou porção de ligação a antigénio do mesmo liga-se ao domínio extracelular da ALK-1 humana com uma valor de avidéz de 100 nM ou menos como medido pela ressonância de plasmão superficial. Numa outra instância, o anticorpo ou porção se liga ao domínio extracelular da ALK-1 humana com um valor de avidéz menos do que 10 nM, menos do que 5 nM, menos do que 1 nM, menos do que 500 pM, menos do que 100 pM, menos do que 50 pM, menos do que 20 pM, menos do que 10 pM, ou menos do que 1 pM, medido pela ressonância de plasmão superficial. Em certas instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 100 nM. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 5 nM. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 500 pM. Em outras instâncias, o valor de avidéz é de 1 pM a 100 pM. Em outras instâncias, a avidéz é de 1 pm a 10 pm.

Em outra instância, o anticorpo ou porção do mesmo possui um índice de dissociação (k_{off}) para ALK-1 humana de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou menor quando medido pela ressonância de plasmão superficial. Por exemplo, em certas instâncias o anticorpo ou porção possui um k_{off} para ALK-1 humana de menos do que 10^{-3} s^{-1} menos do que $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos do que

10^{-4} s^{-1} , menos do que $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ menos do que 10^{-5} s^{-1} , ou menos do que $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Em outras instâncias, o k_{off} é de 10^{-6} s^{-1} para 10^{-4} s^{-1} . Em outras instâncias, o k_{off} é de 10^{-6} s^{-1} a $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Numa outra instância, o anticorpo ou porção deste se liga à ALK-1 de primata com um K_D de 1000 nM ou menos. Numa outra instância, o anticorpo ou porção liga-se à ALK-1 humana com um K_D de menos do que 600 nM, menos do que 100 nM, menos do que 50 nM, menos do que 20 nM, menos do que 10 nM, ou menos do que 1 nM, como medido pela ressonância de plasmão superficial. Em certas instâncias, o K_D é de 1 μM a 100 nM. Em outras instâncias, o K_D é de 100 nM a 10 nM. Em outras instâncias, K_D é de 50 nM a 0,1 nM. Tais valores de K_D podem ser medidos por qualquer técnica conhecida dos peritos na especialidade, tal como por ELISAs, RIAs, citometria de fluxo, ou ressonância de plasmão superficial, como BIACORE™.

Em outra instância, o anticorpo ou porção do mesmo possui uma maior afinidade de ligação para a ALK-1 de primata ($K_D(P)$) do que para a ALK-1 de roedores ($K_D(R)$). Numa instância, os anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos da presente divulgação têm um $K_D(R)/K_D(P)$, que é maior ou igual a 1,5. Numa outra instância os antígenos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos da presente divulgação possuem um $K_D(R)/K_D(P)$, que é maior ou igual a 2, maior ou igual a 3, maior ou igual a 5, maior ou igual a 10, maior ou igual a 20, maior ou igual a 50, maior ou igual a 100, maior ou igual a 200, maior ou igual a 500, ou maior ou igual a 1000. Tais valores de K_D tanto para ALK-1 de primata quanto para ALK-1 de roedor podem ser medidos por qualquer técnica conhecida pelos peritos na especialidade, tal como por citometria de fluxo, ELISA, RIA, ou ressonância de plasmão superficial, tal como BIACORE™.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção

do mesmo tem uma CI_{50} de 500 nM ou menos como medido pela sua capacidade de inibir a regulação positiva de um gene alvo a jusante específico da ALK-1, Id1. Numa outra instância, a dita CI_{50} é menor do que 300 nM, menor do que 200 nM, menor do que 150 nM, menor do que 100 nM, menor do que 50 nM, menor do que 20 nM, menor do que 10 nM ou menor do que 1 nM. Em certas instâncias, a CI_{50} é de 1 nM a 500 nM. Em outras instâncias, o CI_{50} é de 5 nM a 250 nM. Em outras instâncias, o CI_{50} é de 10 nM a 100 nM.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo possui uma CI_{50} de 250 nM ou menos como medido pela sua capacidade de inibir a fosforilação Smad1 determinada pelo *Western Blotting* utilizando Odyssey Infrared Imaging System. Numa outra instância, a dita CI_{50} é menor do que 200 nM, menor do que 150 nM, menor do que 100 nM, menor do que 50 nM, menor do que 20 nM, menor do que 10 nM, ou menor do que 1 nM. Em certas instâncias, a CI_{50} é de 1 nM a 250 nM. Em outras instâncias, a CI_{50} é de 5 nM a 200 nM. Em outras instâncias, a CI_{50} é de 10 nM a 100 nM.

Numa outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo inibe angiogénese dos vasos humanos num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, em que células tumorais de melanoma humano M24met são intradermicamente implantadas como determinado pela análise IHC do ensaio de sinal CD-31 humano em pelo menos 40% em comparação com uma amostra de controlo. Numa outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo inibe a angiogénese dos vasos humanos num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, em que as células tumorais do melanoma humano M24met são intradermicamente implantadas em pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60% quando comparado com uma amostra de controlo.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo possui uma EC_{50} de 500 nM ou menos como medido

pela sua capacidade de inibir a angiogénese dos vasos humanos num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, em que células tumorais do melanoma humano M24met são intradermicamente implantadas. Numa outra instância, a dita EC_{50} é menor do que 400 nM, menor do que 300 nM, menor do que 200 nM, menor do que 150 nM, menor do que 100 nM, menor do que 50 nM, menor do que 25 nM, ou menor do que 5 nM. Em certas instâncias, a EC_{50} é de 5 nM a 500 nM. Em outras instâncias, a CI_{50} é de 25 nM a 300 nM. Em outras instâncias, a CI_{50} é de 50 nM a 150 nM.

Numa outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo inibe angiogénese dos vasos humanos num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, em que uma mistura de colagénio acrescido de células endoteliais humanas macrovasculares é intradermicamente implantada como determinado pela análise IHC do ensaio de sinal CD-31 humano em pelo menos 25% em comparação com uma amostra de controlo. Numa outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo inibe angiogénese dos vasos humanos num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, no qual colagénio é intradermicamente implantado em pelo menos 50% quando comparado com uma amostra de controlo. Numa outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo inibe em pelo menos 75%, em pelo menos 80%, em pelo menos 86%, em pelo menos 90% ou pelo menos 95% em comparação com o controlo.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo concorre para a ligação com a ALK-1 com um anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção

do mesmo inter-concorre para a ligação com a ALK-1 com um anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1 e 5.59.1.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo liga-se ao mesmo epítipo da ALK-1 como um anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo liga-se a ALK-1 com substancialmente o mesmo k_D como um anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1; 5.56.1, 5.57.1 e 5.59.1.

Numa outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo liga-se à ALK-1 com substancialmente o mesmo k_{off} como um anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1; 5.56.1, 5.57.1 e 5.59.1.

Um aspeto adicional da presente divulgação é um anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, e compreende um domínio V_H que é pelo menos

90% idêntico em sequência de aminoácidos a qualquer uma das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104. Numa instância, o dito domínio V_H é pelo menos 91%, pelo menos 93%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, ou 100% idêntico em sequência de aminoácidos a qualquer uma das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104.

Numa instância adicional, o anticorpo ou porção do mesmo conforme reivindicado tem pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, e compreende um domínio V_H que é qualquer das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, ou difere de qualquer uma das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 46; 50; 54; 58; 63; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104 por ter pelo menos uma substituição de aminoácidos conservadora. Por exemplo, o domínio V_H pode diferir em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácidos conservadoras de qualquer uma das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104. Numa instância adicional, qualquer destas substituições de aminoácidos conservadoras pode ocorrer nas regiões CDR1, CDR2, e/ou CDR3.

Um aspeto adicional da presente divulgação é um anticorpo ou porção de ligação a antigénio do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, e compreende um domínio V_L que é pelo menos 90% idêntico em sequência de aminoácidos a qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127. Numa instância, o dito domínio V_L é pelo menos 91%, pelo menos 93%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99%, ou 100% idêntico em sequência de aminoácidos a qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48;

52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127.

Numa instância adicional, o anticorpo ou porção do mesmo tem pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, e compreende um domínio V_L que é qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127, ou difere de qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127 por ter pelo menos uma substituição de aminoácidos conservadora. Por exemplo, o domínio V_L pode diferir em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácidos conservadoras de qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127. Numa instância adicional, qualquer destas substituições de aminoácidos conservadoras pode ocorrer nas regiões CDR1, CDR2, e/ou CDR3.

Outro aspecto da presente divulgação é um anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente em que os domínios V_L e V_H são, cada um, pelo menos 90% idênticos em sequência de aminoácidos aos domínios V_L e V_H , respectivamente, de qualquer um dos anticorpos monoclonais 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1. Por exemplo, os domínios V_L e V_H são cada um pelo menos 91%, 93%, 95%, 97%, 99% ou 100% idênticos nas sequências de aminoácidos para os domínios V_L e V_H , respectivamente, de qualquer um dos anticorpos monoclonais 1.11.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1;

4.62.1, 4.68.1, 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1.

Em outro aspeto da presente divulgação está um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo que é seleccionado a partir do grupo consistindo em:

- a) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 6, e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 8;
- b) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 10, e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 12;
- c) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 14 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 16;
- d) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 18, e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 20;
- e) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 22 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 24;
- f) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 26 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 28;
- g) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 30 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 32;
- h) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 34 e um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 36;
- i) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 38 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 40;
- j) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 42
- um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 44;
- k) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H

conforme apresentado na SEQ ID NO: 46 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 48; l) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 50 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 52; m) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 54 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 56; n) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 58 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 60; o) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 62 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 64; p) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 66 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 68; q) um anticorpo ou porção de ligação a antigénio do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 70 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 72; r) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 74 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 76; s) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 78 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 80; t) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 82 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 84; u) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 86 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 88; v) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 90 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 92; w) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 104 e um domínio V_L

conforme apresentado na SEQ ID NO: 127; x) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 6 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 127; e y) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme apresentado na SEQ ID NO: 104 e um domínio V_L conforme apresentado na SEQ ID NO: 8.

Numa outra instância, para qualquer um dos anticorpos ou de porções dos mesmos, conforme descrito acima, em grupos de a) a v) dos domínios V_H e/ou V_L podem diferir das SEQ ID NOs específicas aqui recitadas em pelo menos uma substituição de aminoácido conservadora. Por exemplo, os domínios V_H e/ou V_L podem diferir da SEQ ID NO recitada em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácido conservadoras. Numa outra instância, qualquer uma destas substituições de aminoácido conservadoras podem ocorrer nas regiões CDR1, CDR2, e/ou CDR3.

Em outra instância, a presente divulgação proporciona um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, em que o domínio V_H é independentemente selecionado a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 80; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 80; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, em pelo menos uma substituição de aminoácidos conservadora, e o domínio V_L é independentemente selecionado a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 88; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127, em pelo menos uma substituição

de aminoácidos conservadora. Por exemplo, os domínios V_H e V_L podem, cada um, diferir das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 98; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 68; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, e 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92 ou 127, respetivamente, em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácidos conservadoras.

Numa instância adicional, a presente divulgação proporciona um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, em que o dito anticorpo ou porção compreende sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 de V_H independentemente selecionadas a partir das sequências de CDR1, CDR2 ou CDR3 de cadeia pesada, respetivamente, encontradas em qualquer uma das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, em pelo menos uma substituição de aminoácidos conservadora. Por exemplo, a CDR1, CDR2 e CDR3 de V_H pode diferir da CDR1, CDR2 e CDR3, respetivamente, de qualquer das SEQ ID NOs: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácidos conservadoras.

Numa instância adicional, a presente divulgação proporciona um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, em que o dito anticorpo ou porção compreende sequências de CDR1, CDR2 e CDR3 de V_L independentemente selecionado a partir das sequências de CDR1, CDR2 ou CDR3 de cadeia leve, respetivamente, encontradas em qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80;

84; 88; 92; ou 127, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127, em pelo menos uma substituição de aminoácidos conservadora. Por exemplo, as CDR1, CDR2 e CDR3 de V_L podem diferir das CDR1, CDR2 e CDR3, respetivamente, de qualquer das SEQ ID NOs: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127 em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácidos conservadoras.

A presente divulgação proporciona ainda um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo conforme reivindicado com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antigénio compreende a CDR1 de V_H e V_L, a CDR2 de V_H e V_L e a CDR3 de V_H e V_L como observadas em qualquer um dos anticorpos monoclonais 11.1;

1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D18A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1.

A presente divulgação proporciona ainda um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antigénio compreende uma cadeia pesada que utiliza um gene V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 ou V_H 4-59 humano. Em algumas instâncias, a cadeia pesada utiliza um gene V_H 3-33 humano, gene D 6-19 humano e um gene J_H 3B humano; um gene V_H 4-31 humano, gene D 6-19 humano e um gene J_H 4B humano; um gene V_H 4-61 humano, gene D 6-19 humano e um gene J_H 4B humano; um gene V_H 4-31 humano, um gene D 3-3 humano e um gene J_H 3B humano; um gene V_H 4-31 humano e um gene J_H 3B humano; um gene V_H 4-59 humano, um

gene D 6-19 humano e um gene J_H 4B humano; um gene V_H 3-11 humano, um gene D 3-22 humano e um gene J_H 6B humano; um gene V_H 3-15 humano, um gene D 3-22 humano e um gene J_H 4B humano; um gene V_H 4-31 humano, um gene D 5-12 humano e um gene J_H 6B humano; um gene V_H 4-31 humano, um gene D 4-23 humano e um gene J_H 4B humano; um gene V_H 4-31 humano, um gene D 2-2 humano e um gene J_H 5B humano; um gene V_H 4-31 humano e um gene J_H 6B humano; gene V_H 3-15 humano, um gene D 1-1 humano e um gene J_H 4B humano; um gene V_H 3-11 humano, um gene D 6-19 humano e um gene J_H 6B humano; um gene V_H 3-11 humano, um gene D 3-10 humano e um gene J_H 6B humano; ou um gene V_H 3-11 humano, um gene D 6-6 humano e um gene J_H 6B humano.

A presente divulgação proporciona ainda um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno compreende uma cadeia leve que utiliza um gene V_K A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 ou V_K L2 humano. Em algumas instâncias, a cadeia leve utiliza um gene V_K L1 humano e um gene J_K 4 humano; um gene V_K A27 humano e um gene J_K 5 humano ou um gene J 4 humano; um gene V_K B3 humano e um gene J_K 1 humano; um gene V_K L2 humano e um gene J_K 3 humano; um gene V_K A2 humano e um gene J_K 1 humano; um gene V_K A3 humano e um gene J_K 4 humano; um gene V_K A1 humano e um gene J_K 1 humano; um gene V_K B2 humano e um gene J_K 4 humano; ou um gene V_K A2 humano e um gene J_K 1 humano.

A presente divulgação proporciona ainda um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antígeno do mesmo com pelo menos uma das propriedades funcionais descritas anteriormente, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno compreende uma ou mais de uma cadeia pesada e/ou cadeia leve da sequência de aminoácido FR1, FR2, FR3 ou FR4 como observado em qualquer um dos anticorpos

monoclonais 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1.

A presente divulgação proporciona ainda um anticorpo monoclonal que compreende as sequências de aminoácidos apresentadas nas: a) SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4; b) SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 102; c) SEQ ID NO: 100 e SEQ ID NO: 4; e d) SEQ ID NO: 100 e SEQ ID NO: 102.

Numa outra instância divulgação existe qualquer um dos anticorpos que é uma molécula de IgG, IgM, IgE, IgA ou IgD, ou derivada das mesmas. Por exemplo, o anticorpo pode ser uma IgG1 ou IgG2.

Outra instância da divulgação proporciona qualquer um dos anticorpos ou porções de ligação a antígeno acima descritos, que é um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um fragmento F_v, um fragmento F_v de cadeia única, um fragmento V_H de cadeia única, um fragmento V_L de cadeia única, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico ou um anticorpo biespecífico.

Numa outra instância existe um anticorpo derivado ou porção de ligação a antígeno que compreende qualquer um dos anticorpos ou porções dos mesmos, conforme descrito anteriormente e pelo menos uma entidade molecular adicional. Por exemplo, a pelo menos uma entidade molecular adicional pode ser um outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, uma etiqueta, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, e/ou uma proteína ou péptido que possa mediar a associação do anticorpo ou porção de anticorpo com outra molécula (tal como uma região de núcleo de estreptavidina ou uma cauda de polihistidina). Por exemplo, os agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou porção de ligação a antígeno da divulgação pode ser derivado incluem

compostos fluorescentes, incluindo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonilo, ficoeritrina, lantanídeos fósforos, e similares. Um anticorpo também pode ser marcado com enzimas que são úteis para a detecção, tais como peroxidase de rábano-silvestre, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase, e similares. Numa outra instância os anticorpos ou porções dos mesmos da presente divulgação também podem ser marcados com biotina, ou com um epítopo de polipéptido predeterminado reconhecido por um repórter secundário (por exemplo, sequências do par do zipper de leucina, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação ao metal, marcadores de epítopo). Em mais uma outra instância da presente divulgação, qualquer um dos anticorpos ou porções dos mesmos pode igualmente ser derivado com um grupo químico tal como polietilenoglicol (PEG), um grupo metilo ou etilo, ou um grupo de hidrato de carbono.

Em algumas instâncias, os anticorpos anti-ALK-1 ou porções de ligação a antigénio revelados no presente documento são anexados a um suporte sólido.

Em algumas instâncias, a lisina C-terminal da cadeia pesada de acordo com qualquer um dos anticorpos anti-ALK-1 da divulgação é clivada. Em várias instâncias da divulgação, as cadeias pesadas e leves dos anticorpos anti-ALK-1 podem opcionalmente incluir uma sequência de sinal.

A presente divulgação também proporciona uma composição farmacêutica que compreende qualquer um dos anticorpos ou porções de ligação a antigénio dos mesmos conforme descrito acima e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Em outra instância, a divulgação refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica qualquer um dos anticorpos ou porções de ligação a antigénio dos mesmos

conforme descrito no presente documento. Numa instância particular, uma molécula de ácido nucleico isolada compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 1, cuja sequência codifica uma cadeia pesada. Em outra instância particular, uma molécula de ácido nucleico isolada compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 3, cuja sequência codifica uma cadeia leve.

Numa outra instância particular uma molécula de ácido nucleico isolada compreende um polinucleótido que compreende uma grelha de leitura aberta da sequência de ADNc de um clone depositado sob um número de acesso de ATCC PTA-6864. Em outra instância particular uma molécula de ácido nucleico isolada compreende um polinucleótido que compreende uma grelha de leitura aberta da sequência de ADNc de um clone depositado sob o número de acesso de ATCC PTA-6865.

Numa outra instância particular, uma molécula de ácido nucleico isolada compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 95 ou 128, cada uma das sequências codifica uma cadeia pesada. Em outra instância particular, uma molécula de ácido nucleico isolada compreende a sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 101, cuja sequência codifica uma cadeia leve.

A divulgação refere-se ainda a um vetor que compreende qualquer uma das moléculas de ácido nucleico descritas no presente documento, em que o vetor compreende opcionalmente uma sequência de controlo da expressão operativamente ligada à molécula de ácido nucleico.

Uma outra instância proporciona uma célula hospedeira que compreende qualquer um dos vetores descritos no presente documento ou que compreende qualquer uma das moléculas de ácido nucleico descritas no presente documento. A presente divulgação também proporciona uma linha celular isolada, que produz qualquer um dos anticorpos ou porções de ligação a antígeno conforme

descrito no presente documento ou que produz a cadeia pesada ou cadeia leve de qualquer um dos ditos anticorpos ou as ditas porções de ligação a antigénio.

Numa outra instância, a presente divulgação refere-se a um método para a produção de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antigénio do mesmo, que compreende o cultivo de qualquer uma das células hospedeiras ou linhas celulares descritas no presente documento sob condições adequadas e recuperação do dito anticorpo ou porção de ligação a antigénio.

A presente divulgação também se refere a um animal transgénico não humano ou planta transgénica que compreende qualquer um dos ácidos nucleicos descritos no presente documento, em que o animal transgénico não humano ou a planta transgénica expressa o dito ácido nucleico.

A presente divulgação proporciona ainda um método para isolar um anticorpo ou porção de ligação a antigénio do mesmo que se liga à ALK-1, que compreende a etapa de isolar o anticorpo do animal transgénico não humano ou planta transgénica conforme descrito no presente documento.

Numa outra instância, a divulgação refere-se a um hibridoma depositado sob um número de acesso de ATCC de PTA-6808.

A presente divulgação também proporciona um método para determinar se uma substância inibe a regulação positiva de um gene alvo a jusante específico da ALK-1, Id1, o método que compreende o contacto de uma primeira amostra de células que expressam Id1 com a substância e determinar se a expressão Id1 é inibida, em que um nível reduzido de expressão Id1 na primeira amostra de células colocada em contacto com a substância em comparação a uma amostra de controlo de células é indicativo da referida substância que inibe a expressão Id1. A presente divulgação proporciona ainda o método, em que a substância é um anticorpo que se liga ao domínio extracelular da ALK-1.

A presente divulgação proporciona também um método para tratar o crescimento celular anormal num mamífero em necessidade do mesmo, que compreende a etapa de administrar ao dito mamífero qualquer um dos anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos, ou qualquer uma das composições farmacêuticas, conforme descrito no presente documento. A presente divulgação proporciona ainda um método para o tratamento do crescimento anormal de células num mamífero em necessidade do mesmo com um anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo que se liga à ALK-1 que compreende as etapas de administrar ao dito mamífero uma quantidade eficaz de qualquer uma das moléculas de ácido nucleico descritas no presente documento sob condições adequadas que permitem a expressão das ditas moléculas de ácido nucleico. Numa outra instância, o método de tratamento do crescimento anormal de células compreende administrar uma quantidade de uma ou mais substâncias selecionadas dos agentes antitumorais, agentes anti-angiogêneses, inibidores da transdução de sinal e agentes antiproliferativos, em que as quantidades são juntas eficazes no tratamento do dito crescimento celular anormal. Nas instâncias particulares, o dito crescimento celular anormal é canceroso.

A presente divulgação também proporciona uma proteína ALK-1 de macaco *Cynomolgus* isolada que tem uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 93. A presente divulgação proporciona ainda uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma proteína que tem uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 93. A presente divulgação proporciona ainda uma molécula de ácido nucleico isolada da SEQ ID NO: 94.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 mostra um exemplo dos dados de ligação ao epítipo. O anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A) foi injetado durante 10 minutos seguido por uma segunda injeção de 10

minutos do anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A). Isto define a resposta máxima para uma injeção de 20 minutos destes anticorpos. A resposta máxima da injeção de 20 minutos foi similarmemente determinada para o anticorpo 1.27.1. O anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A) foi injetado durante 10 minutos seguido por uma injeção de 10 minutos do anticorpo 1.27.1. Se a resposta total diminui entre as respostas máximas definidas, então os dois anticorpos devem se ligar ao mesmo epítopo. Se a resposta total exceder a resposta máxima mais elevada, então os anticorpos devem ligar-se a diferentes epítopos. A experiência foi repetida com a ordem das injeções invertida conforme descrito no Exemplo 9.

A figura 2 mostra o alinhamento da sequência de proteínas humana e Cyno ALK-1.

A figura 3 mostra a determinação K_D do anticorpo recombinante 1.12.1 que se liga à superfície celular ALK-1. (a) Humano, (b) Cyno.

1.12.1 (rWT) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa.

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo duas mutações específicas de aminoácido (metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída com isoleucina e ácido aspártico na posição 19, na cadeia leve substituída com alanina).

1.12.1 (M29I) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo uma mutação de aminoácido única específica onde a metionina na posição 29 na cadeia pesada foi substituída com isoleucina.

1.12.1 (D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo uma mutação de aminoácido única específica onde o ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve foi substituído por alanina.

A figura 4 mostra exemplos de titulações ID1 usando o

Ensaio Taqman ID1 para as variantes de anticorpo 1.12.1.

1.12.1 refere-se à variante mAb 1.12.1 que foi isolada da hibridoma.

1.12.1 (rWT) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa.

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo duas mutações específicas de aminoácido (metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída com isoleucina e ácido aspártico na posição 19, na cadeia leve substituída com alanina).

1.12.1 (M29I) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo uma mutação de aminoácido única específica onde a metionina na posição 29 na cadeia pesada foi substituída com isoleucina.

1.12.1 (D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo um mutação de aminoácido única específica onde o ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve foi substituído por alanina.

A figura 5 mostra exemplos de titulações ID1 usando o Ensaio Taqman ID1 para as variantes da sequência de anticorpo 1.12.1 e os derivados Fab.

1.12.1 refere-se à variante mAb 1.12.1 que foi isolada do hibridoma.

1.12.1 (rWT) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa.

1.12.1 (M29I) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo um mutação de aminoácido única específica onde a metionina na posição 29 na cadeia pesada foi substituída com isoleucina.

1.12.1 (D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo uma mutação de aminoácido única específica onde o ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve foi substituído por alanina.

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que

era mAb recombinante expressa contendo duas mutações específicas de aminoácido (metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída com isoleucina e ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve substituído com alanina).

Fab 1.12.1 (M29I/D19A) refere-se ao fragmento Fab da mAb 1.12.1 (M29I/D19A) preparado pela digestão de 1.12.1 (M29I/D19A) IgG1 utilizando papaína.

A figura 6 mostra a incorporação de ALK-1. (a) Monitorizar o anticorpo de neutralização que permanece na superfície celular, (b) Monitorizar o recetor de superfície celular ALK-1 remanescente.

A figura 7A mostra o alinhamento das sequências de domínio variável para anticorpos anti-ALK-1 da divulgação, nas sequências de linha germinal. As mutações comparadas com a linha germinal são claras. As sequências de CDR são sublinhadas. A figura 7B revela o alinhamento das sequências de aminoácidos previstas dos domínios variáveis de cadeia leve para anticorpos anti-ALK-1 1.12.1, 1.14.1, 1.162.1, 1.31.1, 4.62.1 e 4.72.1 na sequência A27 VK da linha germinal humana. As figuras 7C e 7D mostram o alinhamento das sequências de aminoácidos previstas de domínios variáveis de cadeia pesada leve para anticorpos anti-ALK-1 1.12.1, 1.151.1, 1.162.1, 1.8.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1 e 5.34.1 da sequência 4-31 V_H da linha germinal humana.

A figura 8 mostra um exemplo da análise histológica (Coloração de H & E) de uma secção de pele humana enxertada pós-cirúrgica.

A figura 9 (A) mostra a coloração de tricromo de colagénio num ratinho quimérico de pele humana.

A figura 9 (B) mostra a deteção de vasos humanos no gel de colagénio implantado num ratinho quimérico do prepúcio humano. Tex-red: vasos humanos. FITC: vasos de ratinho.

Amarelo: co-coloração.

A figura 10 mostra uma imagem imunofluorescente de vasos humanos (vermelho) e de ratinhos (verde) do tumor M24met no ratinho quimérico do prepúcio humano SCID.

A figura 11 mostra a imagem IHC de vasos humanos (castanho) do tumor M24met no ratinho quimérico de prepúcio humano SCID.

A figura 12 mostra as imagens imunofluorescentes representativas de vasos humanos (vermelho) e de ratinho (verde) do controlo e os tumores M24met tratados com anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A) (10 mg/kg) no ratinho quimérico do prepúcio humano SCID.

A figura 13 mostra a inibição dependente da dose do crescimento de vaso de tumor humano pelo anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A) no modelo de ratinho quimérico do prepúcio humano SCID.

A figura 14 mostra a concentração plasmática do ratinho SCID do anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A).

A figura 15 mostra a EC_{50} estimada para o anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A) no modelo quimérico de M24met prepúcio SCID. O valor de controlo de 100% foi dado uma concentração de soro artificial de 0,1 nM para fins gráficos. Isso não altera a EC_{50} aparente.

Descrição Pormenorizada da Invenção

Definições e Técnicas Gerais

A não ser que de outro modo definido no presente documento, os termos científicos e técnicos utilizados em conexão com a presente divulgação devem ter os significados que são comumente entendidos pelos peritos ordinários na especialidade. Além disso, a não ser que de outro modo requerido pelo contexto, os termos singulares devem incluir pluralidades e os termos no plural devem incluir os singulares. Geralmente, a nomenclatura utilizada em conexão com, e técnicas de, cultura celular e de tecidos, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e de

proteínas e química de ácido nucleico e hibridação descrita no presente documento é aquela bem conhecida e comumente utilizada na técnica.

Os métodos e técnicas da presente divulgação geralmente são realizados de acordo com os métodos convencionais bem conhecidos na técnica e conforme descrito em diversas referências gerais e mais específicas que são citadas e debatidas em todo o presente memória descritiva, a não ser que de outro modo indicado. Veja-se, por exemplo, Sambrook J. & Russell D.. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I. (2000); Ausubel *et al*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I. (1998); e Coligan *et al*, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). As reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante, como comumente executado na técnica ou conforme descrito no presente documento. A nomenclatura utilizada em conexão com, e os procedimentos e técnicas de laboratório, química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica descrita no presente documento são aqueles bem conhecidos e comumente usados na técnica.

Os seguintes termos, a não ser que de outro modo indicado, devem ser entendidos como tendo os seguintes significados:

Como é utilizado no presente documento, o termo "ALK-1" refere-se à cinase-1 tipo recetor de activina de mamífero. O termo ALK-1 destina-se a incluir ALK-1 recombinante e formas quiméricas recombinantes de ALK-1, que podem ser preparadas por métodos de expressão recombinantes padrão.

Como é utilizado no presente documento, o acrónimo "mAb" refere-se a um anticorpo monoclonal.

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo que é referido por número é um anticorpo monoclonal (mAb), que é obtido a partir do hibridoma do mesmo número. Por exemplo, anticorpo monoclonal 1.12.1 é obtido do hibridoma 1.12.1.

1.12.1 refere-se à variante mAb 1.12.1 que foi isolada do hibridoma.

1.12.1 (rWT) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa.

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo duas mutações específicas de aminoácidos (metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída com isoleucina e ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve substituídos com alanina).

1.12.1 (M29I) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo uma mutação de aminoácido única específica onde a metionina na posição 29 na cadeia pesada foi substituída com isoleucina.

1.12.1 (D19A) refere-se à variante mAb 1.12.1 que era mAb recombinante expressa contendo uma mutação de aminoácido única específica onde o ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve foi substituído por alanina.

Como é utilizado no presente documento, o "crescimento anormal de células", salvo indicação em contrário, refere-se ao crescimento celular que é independente dos mecanismos reguladores normais (por exemplo, a perda de inibição de contacto).

Como é utilizado no presente documento, o termo "adjacente" é usado para referir-se às sequências de nucleótido que são diretamente ligadas uma a outra, não tendo nenhum nucleótido. Por meio de exemplo, o pentanucleótido 5'-AAAAA-3' é adjacente ao trinucleótido

5'-TTT-3' quando os dois são conectados desta maneira: 5'-AAAAATTT-3' ou 5'-TTTAAAAA-3', mas não quando os dois são ligados desta maneira: 5'-AAAAAC"nT-3'.

O termo "agente" é utilizado no presente documento para significar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica, ou um extrato produzido a partir de materiais biológicos.

Como é utilizado no presente documento, "aliviar" uma doença, distúrbio ou condição significa reduzir a gravidade dos sintomas da doença, distúrbio ou condição. Isto inclui, mas não é limitado a, afetar o tamanho, crescimento e/ou massa de um tumor, a extensão ou progresso da metástase, e similares, num paciente em comparação com estes mesmos parâmetros no paciente antes ou na ausência do método de tratamento.

Como é utilizado no presente documentos, a sigla "Id1" refere-se a um gene alvo específico a jusante de ALK-1, o gene Id1, que é importante para a angiogénese. O gene Id1 foi relatado para controlar o percurso da angiogénese em certos cancros mediante o desligamento da produção de uma proteína, trombospondina-1 (TSP-1), um supressor da angiogénese de ocorrência natural. Por exemplo, relatou-se que o gene Id1, que é altamente expresso nos cancros melanoma, da mama, da cabeça e pescoço, cerebral, cervical, próstata, pancreático e testicular, resulta da expressão diminuída de TSP-1 e formação aumentada dos vasos sanguíneos tumorais. Volpert, Olga V. et al, "Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1," Cancer Cell, Dez. 2002, Vol. 2, pp. 473-483.

Como é utilizado no presente documento, o termo "Smad" refere-se às proteínas de domínio Smad observadas numo intervalo de espécies de nematoides em seres humanos. Estas proteínas altamente conservadas contêm um domínio N-terminal MH1 que faz contacto com o ADN, e é separado por

uma região articuladora curta do domínio C-terminal MH2, este mostrando uma impressionante semelhança com os domínios associados bifurcados (FHA). Os domínios FHA e Smad (MH2) partilham uma estrutura comum consistindo numa sanduíche de onze filamentos beta, em duas folhas com topologia Gree key. As proteínas Smad mediam a sinalização pelas citocinas TGF-beta/activina/BMP-2/4 dos recetores Ser/Thr proteína cinases na superfície celular até o núcleo. As proteínas Smad dividem-se em três classes funcionais: os Smads regulados pelo recetor (R-Smads), incluindo Smad1, -2, -3, -5 e -8, cada um dos quais está envolvido numa via de sinalização específica do ligando; os Smads co-mediadores (co-Smads), incluindo Smad4, que interagem com os R-Smads para participar na sinalização; e os Smads inibidores (I-Smads), incluindo Smad-6 e -7, que bloqueiam a ativação dos R-Smads e Co-Smads, assim negativamente regulando os percursos de sinalização.

Como é utilizado no presente documento, o termo "TGF-beta" refere-se aos fatores do crescimento-beta transformantes, que constitui uma família de citocinas multifuncionais (TGF-beta 1 -5) que regulam o crescimento e diferenciação celular. O fator de crescimento transformante (TGF) é um dos muitos fatores do crescimento caracterizados que existem na natureza. Ele desempenha papéis fundamentais em ratinhos "SCID" com imunodeficiência combinada grave. Muitas células sintetizam o TGF-beta, e essencialmente todas possuem recetores específicos para este péptido. O TGF-beta regula as ações de muitos outros fatores do crescimento peptídicos e determina uma direção positiva ou negativa dos seus efeitos. O TGF-beta é uma citocina supressora de tumor com efeitos inibidores do crescimento em células epiteliais. O TGF- β pode também funcionar como um promotor de tumor mediante a extração de uma transição de epitelial a mesenquimal. O TGF- β inativa várias proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular e,

desse modo, exerce seus efeitos inibidores do crescimento sobre as células epiteliais por causar-lhes a detenção na fase G1 do ciclo celular. A proteína funciona como um homodímero ligado a dissulfeto. Sua sequência caracteriza-se pela presença de vários resíduos de cisteína C-terminais, que formam o interbloqueamento das ligações de dissulfeto organizadas numa topologia semelhante a nó. Uma disposição de "cistina-nó" similar foi observada nas estruturas de alguns inibidores da enzima e neurotoxinas que se ligam aos canais Ca^{2+} ativados por voltagem, embora a topologia precisa seja diferente. Os genes TGF-beta são expressos diferencialmente, sugerindo que as várias espécies de TGF-beta possam ter funções fisiológicas distintas *in vivo*.

Como é utilizado no presente documento, o termo "TGF-beta 1" refere-se ao recetor do fator beta de crescimento transformante tipo 1, que é um péptido de 112 resíduos de aminoácido mediante a clivagem proteolítica do C-terminal de uma proteína precursora. Exame dos níveis de ARNm o TGF-beta 1 em tecidos adultos murinos indica que a expressão é predominante no baço, pulmão e placenta. O TGF-beta 1 é suposto de desempenhar papéis importantes nos processos patológicos.

Como é utilizado no presente documento, o termo "SCID" refere-se aos ratinhos com imunodeficiência combinada grave.

Como é utilizado no presente documento, o termo "HUVEC" refere-se às células endoteliais da veia umbilical humana.

Como é utilizado no presente documento, os "aminoácidos" são representados pelo seu nome completo, pelo código de três letras correspondente, ou pelo código de uma letra correspondente, conforme indicado no seguinte quadro:

Nome Completo	Código de Três Letras	Código de Um Letra
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptofano	Trp	W

Como é utilizado no presente documento, os vinte aminoácidos convencionais e respectivas abreviaturas seguem a utilização convencional. Veja-se Immunology-A Synthesis (2^a Edição, E. S. Golub e D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Uma "substituição conservadora de aminoácidos" é aquela em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que tem um grupo R de cadeia lateral com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservadora não irá alterar substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que

duas ou mais sequências de aminoácidos diferem uma da outra por substituições conservadoras, a identidade de sequência percentual ou grau de semelhança pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Meios para fazer esse ajuste são bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994).

Exemplos de grupos de aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades químicas semelhantes incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e; 2) cadeias laterais de hidroxilo alifáticas: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina, histidina; 6) cadeias laterais acídicas: ácido aspártico e ácido glutâmico; e 7), cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Os grupos de substituição conservadora de aminoácidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, e asparagina-glutamina.

Alternativamente, uma substituição conservadora é qualquer mudança que tem um valor positivo na matriz de probabilidade log PAM250 divulgada em Gonnet *et al.*, *Science* 256:1443-45 (1992).

A substituição "moderadamente conservadora" é qualquer mudança que tem um valor não negativo na matriz de probabilidade log PAM250.

Em certas instâncias, as substituições de aminoácido num anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antigénio do mesmo são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade vinculativa para formar complexos de proteína, e (4) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos, mas ainda

retêm a ligação específica para ALK-1. Os análogos podem incluir várias substituições na sequência de péptido de ocorrência normal. Por exemplo, uma ou múltiplas substituições de aminoácido, de preferência substituições de aminoácido conservadoras, podem ser preparadas na sequência de ocorrência normal, por exemplo, na parte do polipéptido fora do(s) domínio(s) que formam os contactos intermoleculares. As substituições de aminoácido também podem ser feitas no(s) domínio(s) que forma(m) os contactos intermoleculares que podem melhorar a atividade do polipéptido. Uma substituição de aminoácido conservadora não deve alterar substancialmente as características estruturais da sequência de origem; por exemplo, um aminoácido de substituição de não alterar a lâmina 3 antiparalela que confeciona o domínio de ligação da imunoglobulina que ocorre na sequência de origem, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a sequência de origem. Em geral, a glicina e a prolina não devem ser usadas numa lâmina β antiparalela. Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipéptido reconhecidos na técnica são descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman e Company, Nova Iorque (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nova Iorque, N.I. (1991)); e Thornton *et al.*, *Nature* 354:105 (1991).

A similaridade de sequência para os polipéptidos, que também é referida como a identidade de sequência, é tipicamente medida utilizando *software* de análise de sequência. O *software* de análise de proteína compara as sequências similares utilizando medidas de similaridade atribuída às várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo as substituições de aminoácido conservadoras. Por exemplo, GCG contém programas como "Gap" e "Bestfit" que podem ser usados com parâmetros de valor

padrão para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência entre os polipéptidos estritamente relacionados, tais como polipéptidos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína tipo selvagem e uma versão mutada desta. Veja-se, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipéptidos também podem ser comparadas usando FASTA utilizando parâmetros padrão ou recomendados, um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) proporciona alinhamentos e identidade de sequência percentual das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Outro algoritmo preferido quando se compara uma sequência da divulgação com um banco de dados contendo um grande número de sequências de diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente *blastp* ou *tblastn*, usando parâmetros padrão. Veja-se, por exemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

O comprimento das sequências de polipéptido comparado para homologia será geralmente pelo menos cerca de 16 resíduos de aminoácido, geralmente pelo menos cerca de 20 resíduos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 resíduos, tipicamente pelo menos cerca de 28 resíduos, e preferivelmente mais do que cerca de 35 resíduos. Ao pesquisar uma base de dados contendo sequências de um grande número de diferentes organismos, é preferível comparar as sequências de aminoácido. O termo "análogo" conforme usado neste documento refere-se aos polipéptidos que são compreendidos de um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que possui identidade substancial com uma parte de uma sequência de aminoácido de ocorrência natural deduzida e que possui pelo menos uma das propriedades do polipéptido de ocorrência natural. Tipicamente, os análogos

de polipéptido compreendem uma substituição de aminoácido conservadora (ou adição ou deleção) com relação à sequência de ocorrência natural. Os análogos tipicamente são pelo menos 20 aminoácidos de extensão, preferivelmente pelo menos 50 aminoácidos de extensão ou mais longos, e podem muitas vezes ser tão longos quanto um polipéptido de ocorrência natural de comprimento total.

Os análogos de péptido são comumente utilizados na indústria farmacêutica como fármacos não péptidos com propriedades análogas às daquelas do péptido padrão. Estes tipos de composto não péptido são denominados "miméticos de péptido" ou "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber e Freidinger *TINS* p. 392 (1985); e Evans *et al.*, *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987).

Tais compostos são frequentemente desenvolvidos com o auxílio da modelagem molecular computadorizada.

Os miméticos de péptido que são estruturalmente similares aos péptidos terapeuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente similares a um polipéptido paradigma (isto é, um polipéptido que possui uma propriedade bioquímica ou atividade farmacológica), tais como anticorpos humanos, mas têm uma ou mais ligações peptídicas opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada a partir do grupo consistindo em: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis e trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, e $\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bem conhecidos na técnica. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina no lugar de L-lisina) pode ser usada para gerar péptidos mais estáveis. Além disso, os péptidos restritos que compreendem uma sequência de consenso ou uma variação de sequência de consenso substancialmente idêntica podem ser gerados por métodos conhecidos na técnica (Rizo e

Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)), por exemplo, mediante a adição de resíduos de cisteína internos capazes de formar pontes de dissulfeto intramoleculares que ciclizam o péptido.

Um "anticorpo" ou "imunoglobulina" (Ig) intacta compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) (cerca de 50 a 70 kDa) e duas cadeias leves (L) (cerca de 25 kDa) interligadas por ligações de dissulfeto. Existem apenas dois tipos de cadeia leve: λ e K. Nos seres humanos elas são semelhantes, mas apenas um tipo está presente em cada anticorpo. As cadeias pesadas são classificadas como μ , δ , γ , α , ou ϵ , e definem o isotipo de anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respetivamente. Veja-se de uma forma geral, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N.I. (1989)). Numa instância preferida, o anticorpo é uma IgG e é um subtipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Numa instância mais preferida, o anticorpo anti-ALK-1 é a subclasse IgG2.

Cada cadeia pesada está compreendida de um domínio variável de cadeia pesada (V_H) e uma região constante de cadeia pesada (C_H). A região constante de cadeia pesada está compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta de um domínio variável de cadeia leve (V_L) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve está compreendida de um domínio, CL. Dentro das cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são unidas por um região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada incluindo também uma região "D" de cerca de 3 ou mais aminoácidos. As regiões V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas "regiões determinantes de complementaridade" (CDR1), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas "regiões *framework*" (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro RFs, dispostas de amino-

terminal a carboxil-terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. A atribuição dos aminoácidos para cada domínio está de acordo com as definições de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 e 1991)), ou Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 -917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989).

Os domínios variáveis de cada par de cadeia pesada/leve (V_H e V_L) formam o local de ligação de anticorpos que interage com um antígeno. Assim, um anticorpo IgG intacto, por exemplo, possui dois locais de ligação. Exceto nos anticorpos bifuncionais ou biespecíficos, os dois locais de ligação são os mesmos. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina para hospedar os tecidos ou fatores, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras), e a primeira porção (CIq) do sistema complementar clássico.

Os anticorpos devem ter bastante diversidade de ligação a antígeno para reconhecer todos os possíveis agentes patogénicos (muitas regiões V), enquanto mantém a eficácia biológica das suas regiões C (algumas regiões C). Os genes Ig são aleatoriamente cortados juntos dos segmentos genéticos que permitem muitas regiões V serem utilizadas com algumas regiões C. Os segmentos genéticos que codificam as cadeias Ig H, κ e λ são observados em três diferentes cromossomas. Durante o desenvolvimento das células B, as enzimas recombinase removem os intrões e alguns exões do ADN e ligam os segmentos em genes funcionais Ig.

Os segmentos genéticos Ig em mamíferos são dispostos em grupos de exões "variáveis" (V), "diversidade" (D), "união" (J), e "constante" (C). Os segmentos κ V (V_K), cada um, codificam os dois primeiros CDR e três FR da região V de cadeia κ , acrescido de alguns resíduos de

CDR3. Os segmentos J capa (J_K), cada um, codificam o restante da CDR3 e os quatro FR. C capa (C_K) codifica a região C completar da cadeia leve capa. O ADN que codifica a cadeia capa humana inclui aproximadamente 40 segmentos V capa (V_K) funcionais, cinco segmentos J capa (J_K) e um segmento genético C capa (C_K), assim como alguns segmentos genéticos que contêm codões de interrupção ("pseudogenes"). O ADN de cadeia lambda (λ) humano contém aproximadamente 30 segmentos V lambda ($V\lambda$) funcionais e quatro séries funcionais de segmentos J lambda ($J\lambda$) e C lambda ($C\lambda$). Um J lambda ($J\lambda$) particular sempre emparelha com seu C lambda ($C\lambda$) correspondente, ao contrário do J capa (J_K) em que todos emparelham com o mesmo C capa (C_K). O ADN para cadeia H de ser humano inclui aproximadamente 50 segmentos V_H funcionais, 30 segmentos D_H , e seis segmentos J_H . Os dois primeiros CDR e três FR do domínio variável de cadeia pesada são codificados por V_H . O CDR3 é codificado por alguns nucleótidos de V_H , todos de D_H , e parte de J_H , enquanto o FR4 é codificado pelo restante do segmento genético J_H . Há também segmentos genéticos individuais no ADN para cada domínio de cadeia pesada e região de membrana de cada isotipo, dispostos na ordem em que eles são expressos pelas células B.

O termo "polipéptido" abrange as proteínas nativas ou artificiais, fragmentos de proteína e análogos de polipéptido de uma sequência de proteína. Um polipéptido pode ser monomérico ou polimérico.

O termo "proteína isolada", "polipéptido isolado" ou "anticorpo isolado" é uma proteína, polipéptido ou anticorpo que, em virtude da sua origem ou fonte de derivação (1), não é associado com as porções naturalmente associadas que o acompanham em seu estado nativo, (2) é livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Desta forma, um polipéptido que é quimicamente

sintetizado ou sintetizado num sistema celular diferente da célula da qual naturalmente se origina será "isolado" de suas porções naturalmente associadas. Uma proteína também pode ser apresentada substancialmente isenta de porções naturalmente associados por isolamento, utilizando técnicas de purificação de proteína bem conhecidas na especialidade.

Exemplos de anticorpos isolados incluem, mas não limitado a eles, um anticorpo anti-ALK-1 que foi purificado por afinidade usando ALK-1, e um anticorpo anti-ALK-1 que foi sintetizado por uma linha celular *in vitro*.

Uma proteína ou polipéptido é "substancialmente pura", "substancialmente homogênea", ou "substancialmente purificada" quando pelo menos cerca de 60 a 75% de uma amostra apresenta uma única espécie de polipéptido. O polipéptido ou proteína pode ser monomérico ou multimérico. Um polipéptido ou proteína substancialmente pura pode tipicamente compreender cerca de 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% p/p de uma amostra da proteína, mais geralmente cerca de 95%, e de preferência pode ser mais de 99% pura. A pureza ou homogeneidade de proteína pode ser indicada por vários meios bem conhecidos na técnica, tais como a eletroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína, seguido pela visualização de um intervalo de polipéptido único após a coloração do gel com uma mancha bem conhecido na técnica. Para certos propósitos, resolução mais elevada pode ser fornecida por HPLC ou utilizando outros meios bem conhecidos na técnica de purificação.

O termo "fragmento de polipéptido", como é utilizado no presente documento refere-se a um polipéptido que possui uma anulação amino-terminal e/ou carboxi terminal, mas onde a sequência de aminoácido remanescente é idêntica às posições correspondentes na sequência de ocorrência natural. Em algumas instâncias, os fragmentos são pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento. Em outras instâncias, os fragmentos são pelo menos 14, pelo menos 20,

pelo menos 50, ou pelo menos, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento.

O termo "análogo" ou "análogo de polipéptido", conforme usado neste documento refere-se a um polipéptido que compreende um segmento que possui identidade substancial a alguma sequência de aminoácido de referência e possui substancialmente a mesma função ou atividade como a sequência de aminoácido de referência. Tipicamente, os análogos de polipéptido compreendem uma substituição de aminoácido conservadora (ou inserção ou deleção) com relação à sequência de referência. Os análogos podem ser pelo menos 20 ou 25 aminoácidos de comprimento, ou podem ser pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento ou mais longo, e podem muitas vezes ser tão longos quanto o polipéptido de comprimento total. Algumas instâncias da divulgação incluem fragmentos de polipéptido ou anticorpos análogos de polipéptido com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17 substituições da sequência de aminoácido da linha germinal. Fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem ser facilmente preparados pelos peritos ordinários na especialidade seguindo os ensinamentos deste memória descritiva.

O termo "porção de ligação a antigénio", de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), tal como é utilizado neste documento, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de especificamente se ligar a um antigénio (por exemplo, ALK-1 ou DEC de ALK-1). Foi mostrado que a função de ligação a antigénio de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação incluídos dentro do termo "porção de ligação a antigénio" de um anticorpo incluem: (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo dos domínios V_L , V_H , CL e $Ch1$; (") um Fragmento F $(ab')_2$, um

fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de articulação; (iii) um fragmento Fd consistindo dos domínios V_H e C_{H1} ; (iv) um fragmento Fv consistindo dos domínios V_L e V_H de uma subdivisão única de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste de um domínio V_H ; e (vi) uma complementaridade isolada que determina a região (CDR). Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes distintos, eles podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por um articulador sintético que lhe permite ser produzidos como uma cadeia de proteína única em que o par das regiões V_L e V_H formam moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv)); veja-se, por exemplo, Bird e outros *Science* 242:423-426 (1988) e Huston e outros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5879-5883 (1988)). Tais anticorpos de cadeia única também se destinam a serem englobados dentro do termo "porção de ligação a antigénio", de um anticorpo. Outras formas de anticorpos de cadeia única, tais como diacorpos também são incluídas. Os diacorpos são anticorpos bivalentes biespecíficos no qual os domínios V_H e V_L são expressos numa única cadeia de polipéptido, mas usando um articulador que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando, assim, os domínios emparelharem com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação a antigénio (veja-se, por exemplo, Holliger e outros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6444-6448 (1993); Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-1123 (1994)).

Ainda mais, um anticorpo ou porção de ligação a antigénio do mesmo pode ser parte de moléculas imunoaderentes maiores, formadas pela associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção de anticorpos com uma ou mais de outras proteínas ou péptidos. Exemplos de tais moléculas imunoaderentes incluem a utilização da

região de núcleo de estreptavidina para produzir uma molécula scFv tetramérica (Kipriyanov e outros *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101 (1995)) e a utilização de um resíduo de cisteína, um péptido marcador e uma cauda de polihistidina C-terminal para produzir moléculas scFv bivalentes e submetidas a biotina (Kipriyanov *et al.*, *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Outros exemplos incluem onde um ou mais CDRs de um anticorpo forem incorporados numa molécula ou covalente ou não covalentemente para torná-la uma imunoaderente que se liga especificamente a um antígeno de interesse, tal como a ALK-1 ou DEC de ALK-1. Em tais instâncias, o(s) CDR (s) podem ser incorporados como parte de uma grande cadeia de polipéptido, podem ser covalentemente ligados a uma outra cadeia de polipéptido, ou podem ser incorporados não covalentemente.

As porções de anticorpo, tais como fragmentos Fab e $F(ab')_2$, podem ser preparadas a partir de anticorpos inteiros utilizando técnicas convencionais, tais como digestão de papaína ou pepsina, respetivamente, de anticorpos inteiros. Além disso, os anticorpos, porções de anticorpos e moléculas imunoaderentes podem ser obtidos usando técnicas de ADN recombinante padrão, conforme descrito no presente documento.

Como é utilizado no presente documento, o termo "anticorpos humanos" significa qualquer anticorpo em que as sequências de domínio variáveis e constantes são sequências humanas. O termo abrange anticorpos com sequências derivadas de genes humanos, mas que tenham sido alterados, por exemplo, para diminuir possível imunogenicidade, aumentar a afinidade, eliminar cisternas que possam causar dobraduras indesejáveis, etc. O termo também abrange tais anticorpos produzidos recombinantemente em células não humanas, o que poderia conceder glicosilação não típica das células humanas. Estes anticorpos podem ser preparados de diversas maneiras, como será descrito a seguir.

Como é utilizado no presente documento, o termo "anticorpo de neutralização", "um anticorpo inibidor" ou anticorpo antagonista, significa um anticorpo que inibe a via de sinalização ALK-1/TGF-beta-1/Smad1. Numa instância preferida, o anticorpo inibe a via de sinalização ALK-1/TGF-beta-1/Smad1 em pelo menos cerca de 20%, de preferência 40%, mais preferivelmente 60%, ainda mais preferivelmente 80%, ou ainda mais preferivelmente 85%. A neutralização ou inibição do potencial dos anticorpos anti-ALK-1 humanos pode ser determinada, por exemplo, pela sua capacidade de inibir a regulação positiva de um gene alvo a jusante específico de ALK-1, Id1, como apresentado no Exemplo 12; inibir a fosforilação Smad1 determinada pela Western Blotting utilizando Odyssey Infrared Imaging Sistema da LI-COR Biosciences como apresentado no Exemplo 13.

O termo "anticorpo quimérico", como é utilizado no presente documento significa um anticorpo que compreende regiões de dois ou mais anticorpos diferentes. Por exemplo, um ou mais dos CDRs de um anticorpo quimérico podem ser derivados de um anticorpo anti-ALK-1 humano. Em outro exemplo, todos os CDRs podem ser derivados de anticorpos anti-ALK-1 humanos. Num outro exemplo, os CDRs de mais de um anticorpo anti-ALK-1 humano podem ser combinados num anticorpo quimérico. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender um CDR1 da cadeia leve de um primeiro anticorpo anti-ALK-1 humano, um CDR2 da cadeia leve de um segundo anticorpo anti-ALK-1 humano e um CDR3 da cadeia leve de um terceiro anticorpo anti-ALK-1 humano, e os CDRs da cadeia pesada podem ser derivados de um ou mais outros anticorpos anti-ALK-1. Além disso, as regiões *framework* podem ser derivadas de um dos anticorpos anti-ALK-1 a partir do qual um ou mais dos CDRs são tomadas, ou a partir de uma ou mais diferentes anticorpos humanos. Além disso, como debatido anteriormente neste documento, o anticorpo

quimérico inclui um anticorpo que compreende uma porção derivado das sequências da linha germinal de mais do que uma espécie.

Em algumas instâncias, um anticorpo quimérico da divulgação é um anticorpo anti-ALK-1 humanizado. Um anticorpo anti-ALK-1 humanizado da divulgação compreende a sequência de aminoácido de uma ou mais regiões *framework* e/ou a sequência de aminoácido de pelo menos uma parte da região constante de um ou mais anticorpos anti-ALK-1 humanos da divulgação e ainda compreende sequências derivadas de um anticorpo anti-ALK-1 não humano, por exemplo, sequências de CDR.

Como é utilizado no presente documento, o termo "ELISA" refere-se a um ensaio imunossorvente ligado a enzima. Este ensaio é bem conhecido dos peritos na especialidade. Exemplos deste ensaio podem ser observados em Vaughan, T.J. *et al.*, Nature Biotech. 14:309-314 (1996), assim como no Exemplo 2 do presente pedido.

O termo "ressonância de plasmão superficial", tal como é utilizado no presente documento, refere-se a um fenômeno ótico que leva em conta a análise das interações bioespecíficas em tempo real mediante a detecção das alterações nas concentrações de proteína dentro de uma matriz biossensora, por exemplo, utilizando o sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden e Piscataway, NJ). Para mais descrições, veja-se Jonsson *et al.*, Ann. Biol. Clin. 51:19 26 (1993); Jonsson *et al.*, Biotechniques 11:620 627 (1991); Jonsson *et al.*, J. Mol. Recognit. 8:125 131 (1995); e Johnsson *et al.*, Anal. Biochem. 198:268 277 (1991).

O termo "afinidade" refere-se a uma medida da atração entre um antígeno e um anticorpo. A atratividade intrínseca do anticorpo para o antígeno é tipicamente expressa como a constante de equilíbrio da afinidade de ligação (K_D) de uma interação anticorpo-antígeno

particular. Diz-se que um anticorpo se liga especificamente a um antígeno quando a K_D for ≤ 1 mM, de preferência ≤ 100 nM. Uma constante da afinidade de ligação K_D pode ser medida pela ressonância de plasmão superficial, por exemplo, utilizando o sistema BIAcore™ como debatido nos Exemplos 7 e 8.

O termo " k_{off} " refere-se à constante da taxa de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular. A constante da taxa de dissociação k_{off} pode ser medida pela ressonância de plasmão superficial, por exemplo, utilizando o sistema BIAcore como debatido nos Exemplos 7 e 8.

O termo "avidez" refere-se à intensidade de combinação funcional de um anticorpo com seu antígeno, que se baseia tanto na afinidade quanto nas valências do anticorpo. Como é utilizado no presente documento, este termo descreve a afinidade aumentada que ocorre como resultado de múltiplos locais de ligação a antígeno numa imunoglobulina.

Como é utilizado no presente documento, o termo "seletividade molecular" refere-se à afinidade de ligação de um anticorpo num antígeno específico sendo maior do que em outros antígenos. Por exemplo, os anticorpos da presente divulgação podem ser seletivos com relação a ALK-1 sobre a ALK-2 através da ALK-7, significando que a afinidade de ligação do anticorpo para ALK-1 é pelo menos 2 vezes maior, por exemplo, 4 vezes, ou 10 vezes, ou 50 vezes, ou 100 vezes ou mais, do que para a ALK-2 através da ALK-7. Tais afinidades de ligação podem ser medidas usando técnicas padronizadas conhecidas dos peritos na especialidade.

O termo "epítipo" inclui qualquer determinante de proteína capaz da ligação específica a uma imunoglobulina ou recetor da célula T ou de outra maneira que interage com uma molécula. Os determinantes epitópicos geralmente consistem de agrupamentos superficiais quimicamente ativos

de moléculas tais como aminoácidos ou hidratos de carbono ou cadeias laterais de açúcar e possuem geralmente três características estruturais tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Um epítopo pode ser "linear" ou "conformacional". Num epítopo linear, todos os pontos de interação entre a proteína e a molécula de interação (tal como um anticorpo) ocorrem linearmente ao longo da sequência primária de aminoácido da proteína. Num epítopo conformacional, os pontos de interação ocorrem através dos resíduos de aminoácido na proteína que são separados um do outro. Assim que um epítopo desejado num antigénio for determinado, é possível gerar anticorpos neste epítopo, por exemplo, utilizando as técnicas descritas na presente divulgação. Alternativamente, durante o processo de descobrimento, a geração e caracterização de anticorpos podem elucidar a informação sobre os epítopos desejáveis. A partir desta informação, é possível então competitivamente fazer o rastreio dos anticorpos para a ligação ao mesmo epítopo. Uma abordagem para alcançar este objetivo é conduzir os estudos de inter-concorrência para encontrar os anticorpos que competitivamente se ligam uns com os outros, isto é, os anticorpos competem para ligação a antigénio. Um processo de produção elevada para anticorpos "de armazenagem" baseado em sua inter-concorrência é descrito no Pedido de Patente Internacional N° WO 03/48731.

Como é utilizado no presente documento, o termo "armazenagem" refere-se a um método para agrupar anticorpos baseado nas suas características de ligação a antigénio. A atribuição de depósitos é um pouco arbitrária, dependendo da forma como são diferentes os padrões de ligação observados para todos os anticorpos testados. Portanto, os depósitos nem sempre se correlacionam com os epítopos determinados por outros meios e não devem ser utilizados para definir os epítopos.

O termo "competir", como é utilizado no presente documento no que refere-se a um anticorpo, significa que um primeiro anticorpo, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, concorre para á ligação a antigénio com um segundo anticorpo, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo, onde a ligação do primeiro anticorpo com seu epítopo é detetavelmente diminuída na presença do segundo anticorpo em comparação com a ligação do primeiro anticorpo na ausência do segundo anticorpo. A alternativa, onde a ligação do segundo anticorpo ao seu epítopo é também detetavelmente diminuída na presença do primeiro anticorpo, pode, mas não necessariamente, ser o caso. Isto é, um primeiro anticorpo pode inibir a ligação de um segundo anticorpo ao seu epítopo sem que o segundo anticorpo iniba a ligação do primeiro anticorpo ao seu respetivo epítopo. No entanto, onde cada anticorpo detetavelmente inibe a ligação do outro anticorpo com o seu epítopo cognato ou ligando, quer para a mesma, maior ou menor extensão, os anticorpos são ditos "de inter-concorrência" uns com os outros para a ligação de seus respetivos epítopos. Os anticorpos tanto de competição quanto de inter-competição são contemplados pela presente divulgação. Independentemente do mecanismo pelo qual tal concorrência ou inter-concorrência ocorre (por exemplo, impedimento estérico, mudança conformacional, ou ligação a um epítopo comum, ou porção do mesmo, e similares), o artífice versado deve observar, com base nos ensinamentos proporcionado no presente documentos, que tais anticorpos concorrentes e/ou inter-concorrentes estão envolvidos e podem ser úteis para os métodos revelados no presente documento.

O termo "polinucleótido" como aqui referido significa uma forma polimérica de nucleótidos de pelo menos 10 bases de comprimento, ou ribonucleótidos ou desoxinucleótidos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleótido. O termo inclui as formas de filamento único ou duplo.

O termo "polinucleótido isolado" aqui usado significa um polinucleótido de origem genômico, ADNc ou sintética ou alguma combinação destes, que em virtude da sua origem o "polinucleótido isolado" (1) não é associado com todos ou uma parte dos polinucleótidos com que o "polinucleótido isolado" é encontrado na natureza, (2) é operativamente ligado a um polinucleótido que não é ligado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

O termo "nucleótidos de ocorrência natural" como é utilizado no presente documento inclui desoxirribonucleótidos e ribonucleótidos. O termo "nucleótidos modificados", conforme usado neste documento inclui nucleótidos com grupos de açúcar modificados ou substituídos e similares. O termo "ligações de oligonucleótido" mencionados neste documento inclui as ligações de oligonucleótido tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato, e similares. Veja-se por exemplo, LaPlanche *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein *et al.*, Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.*, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente US N° 5.151.510; Uhlmann e Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). Um oligonucleótido pode incluir uma etiqueta para detecção, se for desejado.

As sequências "operativamente ligadas" incluem tanto as sequências de controle da expressão que são contíguas com o gene de interesse quanto as sequências de controle da expressão que atuam em *trans* ou numa distância para controlar o gene de interesse.

O termo "sequência de controle da expressão", como é

utilizado no presente documento significa as sequências de polinucleótido que são necessárias para efetuar a expressão e processamento das sequências de codificação a qual elas estão ligadas. As sequências de controlo da expressão incluem as sequências de início, término, promotoras e intensificadoras da transcrição apropriadas; sinais de processamento de ARN eficientes tais como os sinais de junção e poliadenilação; sequências que estabilizam o ARNm citoplasmático; sequências que intensificam a eficiência de translação (ou seja, sequência de consenso Kozak); sequências que aumentam a estabilidade da proteína; e quando for desejado, sequências que intensificam a secreção de proteína. A natureza destas sequências de controlo difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, tais sequências de controlo geralmente incluem promotor, local de ligação ribossómico, e sequência de término da transcrição; em eucariotas, geralmente, tais sequências de controlo incluem promotores e sequência de término da transcrição. O termo "sequências de controlo" destina-se a incluir, no mínimo, todas as porções cuja presença é essencial para a expressão e processamento, e podem também incluir porções adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências líderes e sequências associadas de fusão.

O termo "vetor", como é utilizado no presente documento, significa uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar um outro ácido nucleico a qual foi ligado. Em algumas instâncias, o vetor é um plasmídeo, ou seja, uma parte de filamento duplo do ADN em que os segmentos de ADN adicionais podem ser ligados. Em algumas instâncias, o vetor é um vetor virai, em que os segmentos de ADN adicionais podem ser ligados no genoma viral. Em algumas instâncias, os vetores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos que tem uma origem bacteriana

de replicação e vetores de mamífero epissômicos). Em outras instâncias, os vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não epissômicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira, e desse modo são replicados, juntamente com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de orientar a expressão dos genes para que eles sejam operativamente ligados. Tais vetores são referidos neste documento como "vetores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vetores de expressão").

O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como é utilizado no presente documento, significa uma célula em que um vetor de expressão recombinante foi introduzido. É necessário compreender que "célula hospedeira recombinante" e "célula hospedeira" significam não apenas a célula objeto particular, mas também os descendentes de uma tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer nas gerações que se sucedem devido à mutação ou influências ambientais, tais descendentes não podem, de fato, ser idênticos à célula de origem, mas são ainda incluídos dentro do âmbito do termo "célula hospedeira", como é utilizado no presente documento.

Como é utilizado no presente documento, o termo "linha germinal" refere-se às sequências de nucleótido e sequências de aminoácidos dos genes de anticorpo e segmentos genéticos em que eles são transmitidos de pais para filhos através das células germinativas. Esta sequência da linha germinal é distinguida das sequências de nucleótido que codificam os anticorpos nas células B maduras, que foram alteradas por eventos de recombinação e hipermutação durante o curso de maturação da célula B. Um anticorpo que "utiliza" uma linha germinal particular possui uma sequência de nucleótidos ou aminoácido que se alinha mais estritamente com esta sequência de nucleótidos

da linha germinal ou com a sequência de aminoácido que especifica. Tais anticorpos frequentemente são transformados em comparação com a sequência da linha germinal.

O termo "identidade de sequência percentual" no contexto das sequências de ácido nucleico significa os resíduos em duas sequências que são as mesmas quando alinhadas com relação à correspondência máxima. O comprimento da comparação de identidade de sequência pode ser mais de uma extensão de pelo menos cerca de nove nucleótidos, geralmente, pelo menos cerca de 18 nucleótidos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 nucleótidos, tipicamente pelo menos cerca de 28 nucleótidos, mais tipicamente pelo menos cerca de 32 nucleótidos, e preferivelmente pelo menos cerca de 36, 48 ou mais nucleótidos. Existem vários algoritmos diferentes conhecidos na técnica que podem ser usados para medir a identidade da sequência de nucleótido. Por exemplo, as sequências de polinucleótido podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit, que são programas em Wisconsin Package Versão 10.0; Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que inclui, por exemplo, os programas FASTA2 e FASTA3, proporciona alinhamentos e identidade de sequência percentual das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998)). A não ser que de outro modo especificado, os parâmetros padrão de um programa ou algoritmo particular são utilizados. Por exemplo, a identidade de sequência percentual entre as sequências de ácidos nucleico pode ser determinada utilizando FASTA com os seus parâmetros padrão (um tamanho de palavra 6 e o fator NOPAM para a matriz de pontuação) ou usando Gap com os seus parâmetros padrão como

previsto na GCG Versão 6.1.

Uma referência a uma sequência de nucleótidos abrange o seu complemento a não ser que de outro modo especificado. Assim, uma referência a um ácido nucleico que tem uma sequência particular deve ser entendida de abranger seu filamento complementar, com a sua sequência complementar.

O termo "similaridade substancial" ou "similaridade de sequência substancial", quando refere-se a um ácido nucleico ou seu fragmento, significa que quando idealmente alinhado com as inserções ou deleções de nucleótido apropriadas com outro ácido nucleico (ou a seu filamento complementar), existe identidade sequência de nucleótidos em pelo menos cerca de 85%, de preferência pelo menos cerca de 90% e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases de nucleótido, como medido por qualquer algoritmo bem conhecido da identidade de sequência, tal como FASTA, BLAST ou Gap, como debatido acima.

A expressão "identidade de sequência percentual" no contexto das sequências de aminoácidos significa os resíduos em duas sequências que são os mesmos quando alinhados com relação a correspondência máxima. O comprimento da comparação de identidade de sequência pode ser acrescido de uma extensão de pelo menos cerca de cinco aminoácidos, geralmente pelo menos cerca de 20 aminoácidos, mais geralmente pelo menos cerca de 30 aminoácidos, tipicamente pelo menos cerca de 50 aminoácidos, mais tipicamente pelo menos cerca de 100 aminoácidos, e ainda mais tipicamente cerca de 150, 200 ou mais aminoácidos. Existem vários algoritmos diferentes conhecidos na técnica que podem ser usados para medir a identidade de sequência de aminoácido. Por exemplo, as sequências de aminoácidos podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit, que são programas em Wisconsin Package Versão 10.0; Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin.

Conforme aplicado aos polipéptidos, o termo "identidade substancial" ou "similaridade substancial" significa que duas sequências de aminoácido, quando idealmente alinhadas, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de abertura padrão como fornecidos com os programas, compartilham pelo menos 70%, 75% ou 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 90% ou 95% de identidade de sequência, e mais preferivelmente pelo menos 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência. Em certas instâncias, as posições residuais que não são idênticas diferem pelas substituições de aminoácido conservadoras.

O termo "sequência de sinal", também chamado de péptido sinal, péptido líder, refere-se a um segmento de cerca de 15 a 30 aminoácidos no N terminal de uma proteína que permite a proteína ser segregada (passar através de uma membrana celular). A sequência de sinal é removida quando a proteína é segregada.

Como é utilizado no presente documento, o termo "marcador" ou "marcado" refere-se à incorporação de uma outra molécula no anticorpo. Numa instância, o marcador é um marcador detetável, por exemplo, a incorporação de um aminoácido radiomarcado ou ligação a um polipéptido de porções de biotinilo que pode ser detetado pela avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detetada pelos métodos óticos ou colorimétricos). Em outra instância, o marcador pode ser terapêutico, por exemplo, um conjugado de medicamento ou toxina. Vários métodos de marcação de polipéptidos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcadores para polipéptidos incluem, mas não são limitados a, os seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{91}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos

lantanídeos), marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, (3-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimioluminescentes, grupos de biotinilo, epítomos de polipéptido predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zipper de leucina, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, marcadores de epítopo), agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio, toxinas tais como a toxina da coqueluche, taxoí, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, Diidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos destes. Em algumas instâncias, os marcadores são ligados por subdivisões espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial.

O termo "primata" refere-se a um mamífero da ordem primatas, que inclui os antropoides e prossímios, caracterizados pelo desenvolvimento refinado das mãos e pés, um focinho encurtado, e um grande cérebro. Os mamíferos da ordem Primatas incluem os seres humanos, macacos, e prossímios, ou primatas menores.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se àquela quantidade do agente terapêutico sendo administrado que irá aliviar de certa forma um ou mais dos sintomas do distúrbio a ser tratado. Em referência ao tratamento do cancro, uma quantidade terapeuticamente eficaz refere-se àquela quantidade que possui pelo menos um dos seguintes efeitos: reduzir o tamanho do tumor; inibir (isto é, retardar em certa medida, preferivelmente interromper) a metástase tumoral; inibir em certa medida (isto é, retardar até certo

ponto, preferivelmente interromper) o crescimento tumoral, e aliviar até certo ponto (ou, preferivelmente, eliminar) um ou mais sintomas associados com o cancro.

"Tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se a um método de aliviar ou anular um distúrbio biológico e/ou seus sintomas subordinados. No que refere-se ao cancro, estes termos simplesmente significam que a expectativa de vida de uma pessoa afetada com um cancro será aumentada ou que um ou mais dos sintomas da doença, serão reduzidos.

"Contacto" refere-se levar um anticorpo ou porção do mesmo de ligação a antigénio da presente divulgação e uma ALK-1 alvo, ou epítipo deste, conjuntamente de uma tal maneira que o anticorpo possa afetar a atividade biológica da ALK-1. Tal "contacto" pode ser realizado "*in vitro*", isto é, num tubo de ensaio, uma placa de Petri, ou coisa parecida. Num tubo de ensaio, o contacto pode envolver apenas um anticorpo ou porção do mesmo de ligação a antigénio e ALK-1 ou epítipo deste ou pode envolver todas as células. As células também podem ser mantidas ou cultivadas em placas de cultura celular e colocadas em contacto com anticorpos ou porções dos mesmos de ligação a antigénio neste ambiente. Neste contexto, a capacidade de um anticorpo particular ou porção do mesmo de ligação a antigénio de afetar um distúrbio relacionado com a ALK-1, isto é, a CI_{50} dos anticorpos, pode ser determinado antes da utilização do anticorpo *in vivo* com organismos vivos mais complexos ser obtida. Para as células fora do organismo, existem vários métodos, e são bem conhecidos por aqueles versados na técnica, para colocar em contacto ALK-1 com os anticorpos ou componentes de ligação a antigénio.

O acrónimo "FACS" refere-se à Classificação Celular ativada por Fluorescência. O acrónimo FACS e citometria de fluxo são utilizados de modo trocável. A marcação fluorescente permite a investigação da estrutura e função celular. A imunofluorescência, a aplicação mais amplamente

utilizada, envolve a coloração das células com anticorpos conjugados com corantes fluorescentes tais como a fluoresceína e ficoeritrina. Este método é muitas vezes usado para rotular as moléculas na superfície celular, mas os anticorpos podem ser direcionados em alvos no citoplasma. Na imunofluorescência direta um anticorpo numa molécula é diretamente conjugado a um corante fluorescente, e as células são manchadas numa etapa. Na imunofluorescência indireta o anticorpo primário não é marcado, e um segundo anticorpo fluorescentemente conjugado é adicionado que é específico para o primeiro anticorpo.

Anticorpos Anti-ALK-1

Esta divulgação pertence aos anticorpos monoclonais anti-ALK-1 de neutralização isolada ou porções de ligação a antigénio dos mesmos que se ligam à ALK 1 de primata, preferivelmente o DEC de ALK 1 de primata, mais preferivelmente o DEC de ALK 1 humana. Numa instância preferida, a divulgação pertence aos anticorpos de neutralização isolada que são anticorpos monoclonais completamente humanos ou porções de ligação a antigénio dos mesmos. De preferência, os anticorpos humanos são anticorpos anti-ALK-1 recombinantes humanos que possuem maior afinidade para ALK-1 do que para ALK-2 através de ALK-7. Em algumas instâncias, os anticorpos anti-ALK-1 humanos são produzidos pela imunização de um animal transgénico não humano, por exemplo, um roedor, cujo genoma compreende genes da imunoglobulina humana de modo que o animal transgénico produz anticorpos humanos. Vários aspetos da divulgação referem-se a tais anticorpos e porções de ligação a antigénio, e composições farmacêuticas destes, bem como ácidos nucleicos, vetores de expressão recombinantes e células hospedeiras para produzir tais anticorpos e porções de ligação a antigénio. Os métodos de utilização dos anticorpos e porções de ligação a antigénio da presente divulgação para anular a via de sinalização

ALK-1/TGF-beta-1/Smad1 ou para detetar a ALK-1, quer *in vitro* ou *in vivo*, são também contemplados pela divulgação.

Um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação pode compreender uma cadeia capa humana ou lambda humana ou uma sequência de aminoácido derivada deste. Em algumas instâncias que compreendem uma cadeia leve capa, o domínio variável de cadeia leve (V_L) utiliza um gene A27, A2, A1, A3, B3, B2, L1 e L2 V_K humano. Em algumas instâncias, a cadeia leve utiliza um gene humano V_K L1 e um gene humano Jk 4; um gene humano V_K A27 e um gene humano Jk 5 ou um gene humano Jk 4; um gene humano V_K B3 e um gene humano Jk 1; um gene humano V_K L2 e um gene humano Jk 3, um gene humano V_K A2 e um gene humano J_K 1; um gene humano V_K A3 e um gene humano Jk 4; um gene humano V_K A1 e um gene humano Jk 1; um gene humano V_K B2 e um gene humano J_K 4; ou um gene humano V_K A2 e um gene humano Jk 1.

Em algumas instâncias, o V_L do anticorpo anti-ALK-1 compreende uma ou mais substituições, deleções ou inserções (adições) de aminoácido em relação à sequência de aminoácido da linha germinal V_K . Em algumas instâncias, o V_L do anticorpo anti-ALK-1 compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácido em relação à sequência de aminoácido da linha germinal V_K . Em algumas instâncias, uma ou mais das substituições da linha germinal é nas regiões CDR da cadeia leve. Em algumas instâncias, as substituições de aminoácido V_K em relação à linha germinal estão numa ou mais das mesmas posições como as substituições em relação à linha germinal observada em qualquer um ou mais do V_L dos anticorpos proporcionado no presente documentos como mostrado, por exemplo, na figura 7. Em algumas instâncias, as mudanças de aminoácido estão numa ou mais das mesmas posições, mas envolvem uma substituição diferente do que no anticorpo de referência.

Em algumas instâncias, as substituições de aminoácido em relação à linha germinal ocorrem numa ou mais das mesmas

posições como substituições da linha germinal em qualquer um do V_L de anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1 e 5.59.1, mas as substituições podem representar substituições de aminoácido conservadoras em tal posição em relação ao aminoácido no anticorpo de referência. Por exemplo, se uma posição particular num destes anticorpos for alterada em relação à linha germinal e for glutamato, pode-se substituir aspartato nesta posição. Similarmente, se uma substituição de aminoácido comparada com a linha germinal num anticorpo exemplificado for serina, pode-se conservadoramente substituir treonina por serina nesta posição. As substituições de aminoácido conservadoras são debatidas *supra*.

Em algumas instâncias, o anticorpo anti-ALK-1 compreende uma sequência de aminoácido de cadeia leve de SEQ ID NO: 4. Em outras instâncias, a cadeia leve compreende a sequência de aminoácido de cadeia leve de anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1 ou 5.59.1.

Em algumas instâncias, a cadeia leve do anticorpo anti-ALK-1 humano compreende a sequência de aminoácido V_L de anticorpos 1.12.1 (SEQ ID NO: 8); 1.11.1 (SEQ ID NO: 12); 1.13.1 (SEQ ID NO: 16); 1.14.1 (SEQ ID NO: 20); 1.151.1 (SEQ ID NO: 24); 1.162.1 (SEQ ID NO: 28); 1.183.1 (SEQ ID NO: 32); 1.8.1 (SEQ ID NO: 36); 1.9.1 (SEQ ID NO: 40); 4.10.1 (SEQ ID NO: 44); 4.24.1 (SEQ ID NO: 48); 4.38.1 (SEQ ID NO: 52); 4.58.1 (SEQ ID NO: 56); 4.62.1 (SEQ ID NO: 60); 4.68.1 (SEQ ID NO: 64); 4.72.1 (SEQ ID NO: 68); 5.13.1 (SEQ ID NO: 72); 5.34.1 (SEQ ID NO: 76); 5.53.1 (SEQ ID NO:

80); 5.56.1 (SEQ ID NO: 84); 5.57.1 (SEQ ID NO: 88); ou 5.59.1 (SEQ ID NO: 92); ou dita sequência de aminoácido tendo até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de até 3 substituições de aminoácido não conservadoras. Em outras instâncias a cadeia leve do anticorpo anti-ALK-1 humano compreende a sequência de aminoácido V_L de anticorpos 1.27.1; 1.29.1 ou 1.31.1. Em algumas instâncias, a cadeia leve compreende a sequência de aminoácido a partir do início do CDR1 até o final do CDR3 de qualquer um dos anticorpos precedentes.

Em algumas instâncias, a cadeia leve pode compreender as sequências de aminoácidos das regiões de CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas independentemente das regiões de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve, respectivamente, de dois ou mais anticorpos monoclonais selecionados de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1 ou 5.59.1, ou ditas regiões de CDR cada uma tendo menos do que 3 ou menos do que 2 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não conservadoras.

Em certas instâncias, a cadeia leve do anticorpo anti-ALK-1 compreende as sequências de aminoácidos das regiões de CDR1, CDR2 e CDR3 de cadeia leve de um anticorpo selecionado de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1, 5.57.1 ou 5.59.1, ou ditas regiões de CDR cada uma tendo menos do que 3 ou menos do que 2 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido

não conservadoras.

Com referência à cadeia pesada, em algumas instâncias, o domínio variável (V_H) utiliza um gene V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 ou V_H 4-59 humano. Em algumas instâncias, a sequência V_H do anticorpo anti-ALK-1 contém uma ou mais substituições, deleções ou inserções (adições) de aminoácido, coletivamente "mutações", em relação à sequência de aminoácido V_H da linha germinal. Em algumas instâncias, o domínio variável da cadeia pesada compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 mutações da sequência de aminoácido V_H da linha germinal. Em algumas instâncias, a(s) mutação(ões) é/são substituições não conservadoras em comparação com a sequência de aminoácidos da linha germinal. Em algumas instâncias, as mutações estão nas regiões de CDR da cadeia pesada. Em algumas instâncias, a cadeia pesada utiliza um gene humano V_H 3-33, um gene humano D 6-19 e um gene humano J_H 3B; um gene humano V_H 4-31, um gene humano D 6-19 e um gene humano J_H 4B, um gene humano V_H 4-61, um gene humano D 6-19 e um gene humano J_H 4B; um gene humano V_H 4-31, um gene humano D 3-3 e um gene humano J_H 3B; um gene humano V_H 4-31 e um gene humano J_H 3B, um gene humano V_H 4-59, um gene humano D 6-19 e um gene humano J_H 4B, um gene humano V_H 3-11, um gene humano D 3-22 e um gene humano J_H 6B, um gene humano V_H 3-15, um gene humano D 3-22 e um gene humano J_H 4B, um gene humano V_H 4-31, um gene humano D 5-12 e um gene humano J_H 6B; um gene humano V_H 4-31, um gene humano D 4-23 e um gene humano J_H 4B, um gene humano V_H 4-31, um gene humano D 2-2 e um gene humano J_H 5B; um gene humano V_H 4-31 e um gene humano J_H 6B; gene humano V_H 3-15, um gene humano D 1-1 e um gene humano J_H 4B, um gene humano V_H 3-11, um gene humano D 6-19 e um gene humano J_H 6B, um gene humano V_H 3-11, um gene humano D 3-10 e um gene humano J_H 6B; ou um gene humano V_H 3-11, um gene humano D 6-6 e um gene humano J_H 6B.

Em algumas instâncias, as substituições de aminoácido

estão numa ou mais das mesmas posições como as substituições da linha germin*al em qualquer um ou mais dos V_H de anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1; 5,56.1; 5.57.1 ou 5.59.1. Em outras instâncias, as mudanças de aminoácido estão numa ou mais das mesmas posições, mas envolvem uma substituição diferente do que no anticorpo de referência.

Em algumas instâncias, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácido SEQ ID NO: 2. Em outras instâncias, a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácido de cadeia pesada de anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1 ou 5.59.1. Em algumas instâncias, a cadeia pesada compreende sequência de aminoácido V_H de anticorpos 1.12.1 (SEQ ID NOS: 6); 1.11.1 (SEQ ID NO: 10); 1.13.1 (SEQ ID NO: 14); 1,14. 1 (SEQ ID NO: 18); 1.151.1 (SEQ ID NO: 22); 1.162.1 (SEQ ID NO: 26); 1.183.1 (SEQ ID NO: 30); 1.8.1 (SEQ NO ID: 34); 1.9.1 (SEQ ID NO: 38); 4.10.1 (SEQ ID NO: 42); 4.24.1 (SEQ ID NO: 46); 4.38.1 (SEQ ID NO: 50); 4.58.1 (SEQ ID NO: 54); 4.62.1 (SEQ ID NO: 58); 4.68.1 (SEQ ID NO: 62); 4.72.1 (SEQ ID NO: 66); 5.13.1 (SEQ ID NO: 70); 5.34.1 (SEQ ID NO: 74); 5.53.1 (SEQ ID NO: 78); 5.56.1 (SEQ ID NO: 82); 5.57.1 (SEQ ID NO: 86); ou 5.59.1 (SEQ ID NO: 90); ou dita sequência de aminoácido V_H tendo até 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 ou 11 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de até 3 substituições de aminoácido não conservadoras. Em outras instâncias, a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácido V_H de anticorpo 1.27.1, 1.29.1 ou 1.31.1. Em algumas instâncias, a cadeia

pesada compreende a sequência de aminoácido a partir do início do CDR1 até final do CDR3 de qualquer um dos anticorpos precedentes.

Em algumas instâncias, a cadeia pesada compreende as regiões de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 de anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.18.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1 ou 5.59.1, ou ditas regiões de CDR cada uma tendo menos do que 8, menos do que 6, menos do que 4, ou menos do que 3 substituições de aminoácido conservadoras e/ou um total de três ou menos substituições de aminoácido não conservadoras.

Em algumas instâncias, as regiões de CDR de cadeia pesada são independentemente selecionadas das regiões de CDR de dois ou mais anticorpos selecionados dos anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1; ou 5.59.1. Em outra instância, o anticorpo compreende uma cadeia leve como divulgado acima e uma cadeia pesada como divulgado acima. Numa outra instância, os CDRs de cadeia leve e os CDRs de cadeia pesada são provenientes do mesmo anticorpo.

Em várias instâncias, os anticorpos anti-ALK-1 possuem a(s) sequência(s) de aminoácido de cadeia pesada de comprimento total e cadeia leve de comprimento total, as sequências de aminoácidos V_H e V_L , as sequências de aminoácidos de cadeia pesada CDR1, CDR2 e CDR3 e cadeia leve CDR1, CDR2 e CDR3 ou a sequência de aminoácido de cadeia pesada a partir do início do CDR1 até o final do CDR3 e a sequência de aminoácido de cadeia leve a partir do início do CDR1 até o final do CDR3 de um anticorpo anti-

ALK-1 proporcionado no presente documento.

Um tipo de substituição de aminoácido que pode ser produzido é alterar uma ou mais cisteínas no anticorpo, que pode ser quimicamente reativa, com um outro resíduo, tal como, sem limitação, alanina ou serina. Numa instância, existe uma substituição de uma cisteína não canónica. A substituição pode ser feita num CDR ou região *framework* de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Em algumas instâncias, a cisteína é canónica.

Um outro tipo de substituição de aminoácido que pode ser feita é remover os locais proteolíticos potenciais no anticorpo. Estes locais podem ocorrer num CDR ou região *framework* de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. A substituição de resíduos de cisteína e a remoção dos locais proteolíticos podem reduzir o risco de heterogeneidade no produto de anticorpo e assim aumentar a sua homogeneidade. Outro tipo de substituição de aminoácido é eliminar os pares de asparagina-glicina, que formam os locais de desamidação potenciais, mediante a alteração de um ou de ambos os resíduos.

Em algumas instâncias, a lisina C-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti ALK-1 da divulgação é clivada. Em várias instâncias da divulgação, as cadeias pesadas e leves dos anticorpos anti-ALK-1 podem opcionalmente incluir uma sequência de sinal.

Num aspeto, a divulgação proporciona vinte cinco anticorpos monoclonais anti-ALK-1 humanos inibidores e as linhas celulares do hibridoma que os produzem. Em certas instâncias, os anticorpos da presente divulgação são IgGs designados como: 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29/D19A); 1.12.1 (M29)); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1, 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1 e 5.59.1. Nas instâncias preferidas, o anticorpo anti-ALK-1 humano é

anticorpo 1.12.1, 1.12.1 (M291/D19A), 1.12.1 (M292), 1.12.1 (D19A), 1.27.1, 1.14.1, 1.162.1, 1.31.1, 4.62.1 ou 4.72.1.

Os anticorpos reconhecem os epítomos expostos na superfície sobre antígenos como regiões de sequência linear (primária) ou sequência estrutural (secundária). BIAcore foi utilizado para definir a paisagem do epítopo funcional e determinar a exclusividade do epítopo aos anticorpos anti-ALK-1 exemplificados por esta divulgação.

O Quadro 1 lista os identificadores de sequência (SEQ ID NO) dos ácidos nucleicos que codificam as cadeias leves e pesadas de comprimento total de variantes de anticorpo 1.12.1 e porções contendo o domínio variável de anticorpos anti-ALK-1 da divulgação, e as sequências de aminoácidos deduzidas correspondentes.

Quadro 1

IDENTIFICADORES DE SEQUÊNCIA (SEQ ID NO)								
Anticorpo	COMPRIMENTO TOTAL				PORÇÃO CONTENDO O DOMÍNIO V			
	Pesada		Leve		Pesada		Leve	
	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína
1.11.1					9	10	11	12
1.12.1 (M291/D19A)	1	2	3	4	5	6	7	8
1.12.1	95	100	101	102	103	104	126	127
1.12.1 (rWT)	128	100	101	102	129	104	126	127
1.13.1					13	14	15	16
1.14.1					17	18	19	20
1.151.1					21	22	23	24
1.162.1					25	26	27	28
1.183.1					29	30	31	32
1.8.1					33	34	35	36
1.9.1					37	38	39	40
4.10.1					41	42	43	44

4.24.1					45	46	47	48
4.38.1					49	50	51	52
4.58.1					53	54	55	56
4.62.1					57	58	59	60
4.68.1					61	62	63	64
4.72.1					65	66	67	68
5.13.1					69	70	71	72
5.34.1					73	74	75	76
5.53.1					77	78	79	80
5.56.1					81	82	83	84
5.57.1					85	86	87	88
5.59.1					89	90	91	92

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se ao anticorpo anti-ALK-1 contendo uma mutação de aminoácido única específica na cadeia pesada onde a metionina na posição 29 foi substituída com isoleucina e uma mutação de aminoácido única específica na cadeia leve onde o ácido aspártico na posição 19 foi substituído com alanina conforme descrito no Exemplo 4.

1.12.1 refere-se à variante mAb 1.12.1, que foi isolada dos hibridomas.

1.12.1 (rWT) refere-se à variante mAb 1.12.1 que foi expressa como um mAb recombinante descrito no Exemplo 3.

A divulgação proporciona ainda variantes de cadeia pesada e/ou leve de certos anticorpos anti-ALK-1 humanos listados acima, que compreendem uma ou mais modificações de aminoácido. Para designar as variantes, a primeira letra é o símbolo da letra um para o aminoácido da cadeia de anticorpo de ocorrência natural, o número refere-se à posição do aminoácido (em que a posição um é o aminoácido N-terminal do FR1), e a segunda letra é o símbolo de uma letra para o aminoácido variante.

Em mais outras instâncias, a divulgação inclui anticorpos que compreendem sequências de aminoácidos de domínio variável com mais do que 80%, mais do que 85%, mais

do que 90%, mais do que 95%, mais do que 96%, mais do que 97%, mais do que 98% ou mais do que 99% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de domínio variável de qualquer um dos anticorpos anti-ALK-1 humanos listados acima.

Classe e Subclasse de Anticorpos Anti-ALK-1

A classe e subclasse de anticorpos anti-ALK-1 podem ser determinadas por qualquer método conhecido na técnica. Em geral, a classe e a subclasse de um anticorpo podem ser determinadas utilizando anticorpos que são específicos de uma classe e subclasse particulares de anticorpos. Esses anticorpos estão disponíveis comercialmente. A classe e a subclasse podem ser determinadas por ELISA, Western Blot, assim como outras técnicas. Alternativamente, a classe e a subclasse podem ser determinadas pelo sequenciamento total ou uma parte dos domínios constante das cadeias pesadas e/ou leves dos anticorpos, comparando suas sequências de aminoácidos com as sequências de aminoácidos conhecidas de várias classes e subclasses de imunoglobulinas, e determinando a classe e subclasse dos anticorpos.

A classe de um anticorpo anti-ALK-1 obtido conforme descrito acima pode ser permutada com a outra. Num aspecto da divulgação, uma molécula de ácido nucleico que codifica V_L ou V_H é isolada usando métodos bem conhecidos na técnica tal que não inclui sequências de ácido nucleico que codificam C_L ou C_H . "Antibody Engineering" (Kontermann & Dubel, Eds., Springer-Verlag, Berlin (2001)). As moléculas de ácido nucleico que codificam V_L ou V_H são depois operativamente ligadas a uma sequência de ácido nucleico que codifica um C_L ou C_H , respetivamente, a partir de uma classe diferente de molécula de imunoglobulina. Isto pode ser obtido usando um vetor ou molécula de ácido nucleico que compreende uma cadeia C_L ou C_H , conforme descrito acima. Por exemplo, um anticorpo anti-ALK-1 que foi originalmente IgM pode ser conectado a uma IgG. Além disso,

a comutação de classe pode ser utilizada para converter uma subclasse IgG em outra, por exemplo, a partir de IgG1 para IgG2. Um método preferido para a produção de um anticorpo da divulgação que compreende um isotipo desejado compreende as etapas de isolamento de uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de um anticorpo anti-ALK-1 e uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve de um anticorpo anti-ALK-1, obtenção do domínio variável da cadeia pesada, que liga o domínio variável da cadeia pesada com o domínio constante de uma cadeia pesada do isotipo desejado, expressão da cadeia leve e cadeia pesada ligada numa célula, e colheita do anticorpo anti-ALK-1 com o isotipo desejado.

Em algumas instâncias, o anticorpo anti-ALK-1 é um anticorpo monoclonal. O anticorpo anti-ALK-1 pode ser uma molécula de IgG, uma molécula de IgM, uma molécula de IgE, uma molécula de IgA ou uma molécula de IgD. Numa instância preferida, o anticorpo anti-ALK-1 é uma IgG e é uma subclasse IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Em outra instância preferida, o anticorpo é a subclasse IgG2.

Identificação de Epítomos ALK-1 Reconhecidos pelos Anticorpos Anti-ALK-1

A divulgação proporciona um anticorpo monoclonal anti-ALK-1 humano que se liga à ALK-1 e concorre ou inter-concorre com e/ou liga o mesmo epítopo como: (a) um anticorpo selecionados de 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1, 4.24.1, 4.38.1, 4.58.1, 4.62.1, 4.68.1, 4.72.1, 5.13.1; 5.34.1, 5.53.1, 5.56.1, 5.57.1 e 5.59.1; (b) um anticorpo que compreende um domínio variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácido do domínio V_H em qualquer uma das SEQ ID NOS: 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90 ou 104, (c) Um anticorpo que compreende um domínio

variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácido do domínio V_L em qualquer uma das SEQ ID NOS: e 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88 e 92 ou 127, (d) um anticorpo que compreende tanto um domínio variável de cadeia pesada como definido em (b) quanto um domínio variável de cadeia leve como definido em (c).

Pode-se determinar se um anticorpo liga-se ao mesmo epítopo ou inter-concorre para a ligação com um anticorpo anti-ALK-1 usando métodos conhecidos na técnica. Numa instância, permite-se que o anticorpo anti-ALK-1 da divulgação se ligue à ALK-1 sob condições de saturação e depois se mede a capacidade do anticorpo de teste em se ligar à ALK-1. Se o anticorpo de teste for capaz de se ligar à ALK-1 ao mesmo tempo que o anticorpo anti-ALK-1 de referência, então o anticorpo de teste se liga a um epítopo diferente do que o anticorpo anti-ALK-1 de referência. No entanto, se o anticorpo de teste não for capaz de se ligar à ALK-1 ao mesmo tempo, então o anticorpo de teste se liga ao mesmo epítopo, um epítopo de sobreposição, ou um epítopo que está nas proximidades do epítopo ligado pelo anticorpo anti-ALK-1 da divulgação. Esta experiência pode ser realizada utilizando ELISA, RIA, BIACORE™, ou citometria de fluxo. Para testar se um anticorpo anti-ALK-1 inter-concorre com outro anticorpo anti-ALK-1, pode-se utilizar o método de concorrência descrito acima em duas direções, isto é, determinar se o anticorpo conhecido bloqueia o anticorpo de teste e vice-versa. Numa instância preferida, a experiência é executada utilizando BIACORE™.

Afinidade de Ligação dos Anticorpos Anti-ALK-1 na ALK-1

A afinidade de ligação (K_D) e taxa de dissociação (k_{off}) de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antígeno na ALK-1 podem ser determinadas por métodos conhecidos na técnica. A afinidade de ligação

pode ser medida por ELISA, RIAs, citometria de fluxo,

ou ressonância de plasmão superficial, tal como BIACORE™. A taxa de dissociação pode ser medida pela ressonância de plasmão superficial. Preferivelmente, a afinidade de ligação e taxa de dissociação é medida pela ressonância de plasmão superficial. Mais preferivelmente, a afinidade de ligação e taxa de dissociação são medidas utilizando BIACORE™. Pode-se determinar se um anticorpo possui substancialmente a mesma K_D como um anticorpo anti-ALK-1 mediante a utilização de métodos conhecidos na técnica. Tais métodos de determinação da K_D e k_{off} podem ser utilizados durante o estágio de rastreamento inicial, assim como durante os estágios de otimização subsequentes.

Inibição da Atividade ALK-1 pelo Anticorpo Anti-ALK-1

Os anticorpos monoclonais anti-ALK-1 que inibem a ligação de ALK-1 podem ser identificados usando vários ensaios. Por exemplo, os anticorpos anti-ALK-1 de neutralização podem ser identificados por sua inibição da regulação positiva de um gene alvo a jusante específico de ALK-1, *Id1*, conforme descrito no Exemplo 12. Os anticorpos anti-ALK-1 preferidos possuem uma CI_{50} de não mais de 500 nM, 300 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM ou 1 nM.

Pode-se também determinar a capacidade de um anticorpo anti-ALK-1 em inibir a fosforilação Smad1 determinada pela Western Blotting utilizando Odyssey Infrared Imaging System, conforme descrito no Exemplo 13. Em várias instâncias, o anticorpo anti-ALK-1 possui um CI_{50} neste ensaio de não mais do que 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM ou 1 nM.

Inibição da Angiogênese por Anticorpo Anti-ALK-1

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo inibe angiogênese humana dos vasos como demonstrado num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, em que as células tumorais M24met do melanoma humano são intradermicamente implantadas como

determinado pela análise IHC do ensaio de sinal CD-31 humano por um fator de pelo menos 40% em comparação com uma amostra de controlo tal conforme descrito no Exemplo 17 e apresentado no Quadro 13.

Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo inibe a angiogénese humana dos vasos como demonstrado num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, em que o colagénio é intradérmica implantado conforme determinado pela análise IHC do ensaio de sinal CD-31 humano por um fator de pelo menos 50% quando comparado com uma amostra de controlo conforme descrito no Exemplo 16 e apresentado no Quadro 12.

Seletividade Molecular e de Espécies

Num outro aspeto da divulgação, os anticorpos anti-ALK-1 demonstram seletividade tanto da espécie quanto molecular. Seguindo os ensinamentos da memória descritiva, pode-se determinar a seletividade da espécie ou molecular para o anticorpo anti-ALK usando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, pode-se determinar a seletividade da espécie usando Western Blot, ressonância de plasmão superficial, por exemplo, BIAcore, ELISA, imunoprecipitação ou RIA.

Em algumas instâncias, o anticorpo anti-ALK-1 se liga à ALK-1 primata com uma K_D que é pelo menos duas vezes menor do que a sua K_D para ALK-1 de roedores. Numa outra instância, a K_D para ALK-1 primata é pelo menos 3 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 100 vezes, pelo menos 200 vezes, pelo menos 500 vezes, ou pelo menos 1000 vezes menor do que a sua K_D para ALK-1 de roedores como medido por citometria de fluxo.

Em outras instâncias, o anticorpo anti-ALK-1 possui uma seletividade para ALK-1 sobre ALK-2 através da ALK-7. Em algumas instâncias, o anticorpo anti-ALK-1 não apresenta qualquer ligação específica apreciável para qualquer outra proteína diferente de ALK-1. Preferivelmente, o anticorpo

anti-ALK-1 liga-se ao DEC da ALK-1 humana.

Métodos de Produção de Anticorpos e Linhas Celulares que Produzem Anticorpos

Imunogénio de ALK-1

Em algumas instâncias, o imunogénio ou antigénio de ALK-1 é ALK-1 isolada e/ou purificada. Em algumas instâncias, o imunogénio de ALK-1 é ALK-1 humana. Nas instâncias preferidas, o imunogénio de ALK-1 é o DEC de ALK-1 humana. ALK-1 humana, ou porções antigénicas da mesma, pode ser preparada de acordo com os métodos bem conhecidos pelos peritos na especialidade, ou pode ser adquirida a partir de vendedores comerciais. As sequências de aminoácidos e nucleótido de ALK-1 humana são conhecidas (veja-se, por exemplo, N° de Acesso de registo do Genbank L17075). O gene ACVRL1 que codifica uma ALK-1 de comprimento total é comercialmente disponível da Invitrogen Inc., Clone ID IOH21048. Por exemplo, R & D Systems, Inc. vende a quimera de ALK-1/F_c humana recombinante (Número de Catálogo 370-AL) preparada pela expressão, de uma sequência de ADN que codifica os resíduos de aminoácido DEC 1-118 da ALK-1, cuja sequência de ADN foi fundida a uma sequência de ADN que codifica a região F_c de IgG humano através de uma sequência de ADN que codifica um ligador de polipéptido numa linha celular de mieloma de rato. A quimera ALK-1/F_c humana madura recombinante é uma proteína homodimérica ligada a dissulfeto tendo Asp 22 no amino-terminal. Além disso, o Exemplo 1 descreve a preparação da proteína de etiqueta de His DEC ALK-1 que foi utilizada para a geração de hibridomas que produzem um anticorpo anti-ALK-1 de acordo com a presente divulgação.

Em outras instâncias, o antigénio de ALK-1 é uma célula que expressa ou sobreexpresa a ALK-1. Em outras instâncias, o antigénio de ALK-1 é uma proteína recombinante expressa de levedura, células de insetos, bactérias tais como *E. coli*, ou outros recursos por

tecnologia recombinante.

Imunização

Em algumas instâncias, os anticorpos humanos são produzidos pela imunização de um animal transgênico não humano que compreende dentro de seu genoma alguns ou todos os locais de cadeia pesada e cadeia leve da imunoglobulina humana com um antigénio ALK-1. Numa instância preferida, o animal não humano é um animal XENOMOUSE®. (Abgenix, Inc., Fremont, CA).

Os ratinhos XENOMOUSE® são estirpes de ratinho planejadas que compreendem grandes fragmentos de locais de cadeia pesada e cadeia leve da imunoglobulina humana e são deficientes na produção de anticorpos de ratinho. Veja-se, por exemplo, Green *et al.*, Nature Genetics 7:13-21 (1994) e Patentes US 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 5.152.963, 6.150.584. Veja-se também documentos WO 91/10741, documento WO 94/02602, documento WO 96/34096, documento WO 96/33735, documento WO 98/16654, documento WO 98/24893, documento WO 98/50433, documento WO 99/45031, documento WO 99/53049, documento WO 00/09560 e WO 00/037504.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para produzir anticorpos anti-ALK-1 a partir de anticorpos de animais não-humanos, não ratinhos mediante a imunização de animais transgênicos não humanos que compreendem locais de imunoglobulina humana com um antigénio de ALK-1. Pode-se produzir tais animais utilizando os métodos descritos nos documentos acima citados. Os métodos divulgados nestes documentos podem ser modificados conforme descrito na Patente US 5.994.619, que é por meio desta incorporada por referência. A Patente US 5.994.619 descreve métodos para a produção de novas células e linhas celulares de massa celular interna cultivada (CICM), derivadas de suínos e bovinos, e células CICM transgênicas em que o ADN heterólogo foi inserido. As células transgênicas de CICM

podem ser usadas para produzir embriões, fetos e descendentes transgênicos clonados. A patente '619 também descreve métodos de produzir animais transgênicos que são capazes de transmitir o ADN heterólogo aos seus descendentes. Nas instâncias preferidas da divulgação corrente, os animais não humanos são mamíferos, particularmente ratos, ovinos, suínos, caprinos, bovinos, equinos e galinhas.

Os ratinhos XENOMOUSE® produzem um repertório humano semelhante a adulto de anticorpos completamente humanos e geram anticorpos humanos específicos do antigénio. Em algumas instâncias, os ratinhos XENOMOUSE® contêm aproximadamente 80% do repertório de gene V de anticorpo humano através da introdução da megabase feita sob medida, fragmentos de configuração da linha germinal dos locais de cadeia pesada humana e locais de cadeia leve capa no cromossoma artificial de levedura (YAC). Em outras instâncias, os ratinhos XENOMOUSE® ainda contêm aproximadamente todo o local de cadeia leve lambda humano. Veja-se Mendez *et al.*, Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green e Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), e documento WO 98/24893.

Em algumas instâncias, os animais não humanos que compreendem os genes da imunoglobulina humana são animais que possuem uma imunoglobulina humana "minilocus". No método minilocus, um loc Ig exógeno é imitado através da inclusão de genes individuais do local Ig. Assim, um ou mais genes V_H , um ou mais genes D_H , um ou mais genes J_H , um domínio constante μ , e um segundo domínio constante (preferivelmente um domínio constante gama) são formados numa construção para inserção num animal. Este método é descrito, entre outros, nas Patentes US N° 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 6.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, 5.643.763.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona um método para produzir anticorpos anti-ALK-1 humanizados. Em algumas instâncias, os animais não humanos são imunizados com um antigénio ALK-1 conforme descrito a seguir sob condições que permitem a produção de anticorpos. As células produtoras de anticorpos são isoladas dos animais e ácidos nucleicos que codificam as cadeias pesadas e leves de um anticorpo anti-ALK-1 de interesse, são isoladas das células produtoras de anticorpos isoladas ou de uma linha celular imortalizada produzida a partir de tais células. Estes ácidos nucleicos são subsequentemente planejadas utilizando as técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade e conforme descrito mais a seguir para reduzir a quantidade de sequência não humana, isto é, humanizar o anticorpo para reduzir a resposta imunológica em seres humanos.

A imunização dos animais pode ser feita por qualquer método conhecido na técnica. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Press, 1990. Métodos para a imunização de animais não humanos como ratinhos, ratos, ovinos, caprinos, suínos, bovinos e cavalos são bem conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, *supra*, e Patente US 5.994.619. Numa instância preferida, o antigénio de ALK-1 é administrado com um adjuvante para estimular a resposta imune. Os adjuvantes exemplares incluem adjuvante de Freund completo ou incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) ou ISCOM (complexos imunoestimuladores). Tais adjuvantes podem proteger o polipéptido da dispersão rápida mediante o sequestro num depósito local, ou eles podem conter substâncias que estimulam o hospedeiro a segregar fatores que são quimiotáticas para os macrófagos e outras porções do sistema imune. Preferivelmente, se um polipéptido estiver sendo administrado, o plano de imunização envolverá duas ou mais administrações do polipéptido, espalhadas ao longo de várias semanas. O Exemplo 2 exemplifica um método

para a produção de anticorpos monoclonais anti-ALK-1 em ratinhos XENOMOUSE®.

Produção de Anticorpos e Linhas Celulares de Produção de Anticorpos

Após a imunização de um animal com um antigénio de ALK-1, os anticorpos e/ou células produtoras de anticorpos podem ser obtidos a partir do animal. Em algumas instâncias, o soro contendo anticorpo anti-ALK-1 é obtido a partir do animal por hemorragia ou sacrifício do animal. O soro pode ser utilizado como é obtido do animal, uma fração de imunoglobulina pode ser obtida do soro, ou os anticorpos anti-ALK-1 podem ser purificados a partir do soro.

Em algumas instâncias, as linhas celulares produtoras de anticorpo são preparadas de células isoladas do animal imunizado. Após imunização, o animal é sacrificado e o nódulo linfático e/ou as células B esplénicas são imortalizadas por qualquer meio conhecido na técnica. Métodos de imortalizar as células incluem, mas não são limitados a, transfeção das mesmas com oncogenes, infeção das mesmas com um vírus oncogénico e cultivo das mesmas sob condições que selecionam as células imortalizadas, submissão das mesmas aos compostos carcinogénicos ou mutantes, fusão das mesmas com uma célula imortalizada, por exemplo, uma célula de mieloma, e inativação das mesmas com um gene supressor tumoral. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, *supra*. Se a fusão com células de mieloma for utilizada, as células de mieloma preferivelmente não segregam polipéptidos de imunoglobulina (uma linha celular não secretora).

As células imortalizadas são submetidas a rastreio usando ALK-1, ou uma porção desta. Numa instância preferida, o rastreio inicial é realizado usando um imunoensaio (ELISA) ou um radioimunoensaio ligado a enzima. Um exemplo do rastreio ELISA é fornecido no documento WO 00/37504.

As células produtoras de anticorpos anti-ALK-1, por exemplo, hibridomas, são selecionadas, clonadas e ainda submetidas ao rastreio com relação as características desejáveis, incluindo crescimento robusto, alta produção de anticorpos e características de anticorpo desejáveis, como debatido mais a seguir. Os hibridomas podem ser expandidos *in vivo* em animais singeneicos, em animais que carecem de um sistema imune, por exemplo, ratinhos nus, ou em cultura celular *in vitro*. Métodos de seleção, clonagem e expansão de hibridomas são bem conhecidos daqueles de habilidade usual na técnica.

Numa instância preferida, o animal imunizado é um animal não humano que expressa os genes da imunoglobulina humana e as células B esplênicas são fundidas à uma linha celular de mieloma da mesma espécie como o animal não humano. Numa instância mais preferida, o animal imunizado é um ratinho XENOMOUSE® e a linha celular de mieloma é um mieloma de ratinho não secretor. Em mais uma instância mais preferida, a linha celular de mieloma é P3-X63-Ag8.653 (Coleção Americana de Culturas Celulares). Veja-se, por exemplo, o Exemplo 2.

Assim, numa instância, a divulgação proporciona métodos para produzir uma linha celular que produz um anticorpo monoclonal humano ou um fragmento deste direcionado à ALK-1 que compreende (a) imunizar um animal transgênico não humano descrito no presente documento com ALK-1, uma porção de ALK-1 ou uma célula ou tecido que expressa a ALK-1; (b) deixar o animal transgênico aumentar uma resposta imune à ALK-1; (c) isolar as células produtoras de anticorpos de animais transgênicos; (d) imortalizar as células produtoras de anticorpos; (e) criar as populações monoclonais individuais das células produtoras de anticorpos imortalizados; e (f) submeter o rastreio as células produtoras de anticorpos imortalizadas para identificar um anticorpo direcionado à ALK-1.

Em outro aspeto, a divulgação proporciona uma linha celular que produz um anticorpo anti-ALK-1 humano. Em algumas instâncias a linha celular é uma linha celular de hibridoma. Em algumas instâncias, o hibridoma são hibridomas de ratinho, conforme descrito acima. Em outras instâncias, os hibridomas são produzidos numa espécie não humana, não ratinho tal como ratos, ovinos, suínos, caprinos, bovinos e equinos. Em outra instância, os hibridomas são hibridomas humanos.

Numa outra instância, um animal transgénico é imunizado com um antigénio de ALK-1, as células primárias, por exemplo, células sanguíneas B do baço ou periféricas, são isoladas de um animal transgénico imunizado e as células individuais que produzem anticorpos específicos para o antigénio desejado são identificadas. O ARNm poliadenilado de cada célula individual é isolada e a reação de cadeia polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) é realizada utilizando iniciadores de sentido que fortalecem as sequências de domínio variáveis, por exemplo, degeneram os iniciadores que reconhecem a maior parte ou todas as regiões FR1 dos genes de domínio variáveis de cadeia pesada e leve humanos e iniciadores antisenses que fortalecem as sequências de região constante ou de união. Os ADNc dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve são depois clonados e expressos em qualquer célula hospedeira adequada, por exemplo, uma célula de mieloma, como anticorpos quiméricos com as respetivas regiões constantes de imunoglobulina, tais como os domínios de cadeia pesada e constantes κ ou λ . Veja-se Babcook, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7843-48, 1996.

Os anticorpos anti-ALK-1 podem então ser identificados e isolados conforme descrito no presente documento.

Em outra instância, técnicas de apresentação em fagos podem ser utilizadas para fornecer bibliotecas contendo um repertório de anticorpos com afinidades variáveis para ALK-

1. Para a produção de tais repertórios, é desnecessário imortalizar a células B do animal imunizado. Pelo contrário, as células B primárias podem ser usadas diretamente como uma fonte de ADN. A mistura de ADNc obtida a partir da célula B, por exemplo, derivada do baço, é utilizada para preparar uma biblioteca de expressão, por exemplo, uma biblioteca de apresentação em fagos transfectada em *E. coli*. As células resultantes são testadas com relação a imunorreatividade para ALK-1. Técnicas para a identificação de anticorpos humanos de alta afinidade de tais bibliotecas são descritas em Griffiths *et al.*, EMBO J., 13:3245-3260 (1994); Nissim *et al.*, Ibid, pp. 692-698 e em Griffiths *et al.*, Ibid, 12:725-734.

Em última análise, os clones da biblioteca são identificados os quais produzem afinidades de ligação de uma magnitude desejada para o antígeno e para o ADN que codifica o produto responsável por esta ligação é recuperado e manipulado com relação à expressão recombinante padrão. As bibliotecas de apresentação em fagos também podem ser construídas utilizando sequências de nucleótido anteriormente manipuladas e rastreo de forma semelhante. Em geral, os ADNc que codificam as cadeias pesadas e leves são independentemente fornecidos ou unidos para formar análogos Fv para produção na biblioteca de fago.

A biblioteca de fago é depois submetida o rastreo com relação aos anticorpos com as afinidades mais elevadas para ALK-1 e o material genético recuperado do clone adequado. Outros ciclos de rastreo podem aumentar a afinidade do anticorpo original isolado.

Ácidos Nucleicos, Vetores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes de Produção de Anticorpos

Ácidos Nucleicos

A presente divulgação também abrange moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-ALK-1 ou um

fragmento de ligação a antígeno dos mesmos. Em algumas instâncias, diferentes moléculas de ácido nucleico codificam uma cadeia pesada e uma cadeia leve de uma imunoglobulina anti-ALK-1. Em outras instâncias, a mesma molécula de ácido nucleico codifica uma cadeia pesada e uma cadeia leve de uma imunoglobulina anti-ALK-1.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico que codifica o domínio variável da cadeia leve (V_L) utiliza um gene A27, A2, A1, A3, B3, B2, L1 e L2 V_K humano, e um gene Jk5, Jk1, Jk3 ou Jk4 humano. Em algumas instâncias a molécula de ácido nucleico utiliza um gene A27 V_K humano e um gene Jk5 humano. Em outras instâncias, a molécula de ácido nucleico utiliza um gene humano A2 e um gene humano Jk1. Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve codifica uma sequência de aminoácido que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições da(s) sequência(s) de aminoácido da linha germinal. Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácido V_L que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 substituições de aminoácido conservadoras e/ou 1, 2 ou 3 substituições não conservadora em comparação com as sequências V_K e J_K da linha germinal. As substituições podem ser nas regiões do CDR, nas regiões *framework*, ou no domínio constante.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácidos V_L que compreende uma ou mais mutações em comparação com a sequência da linha germinal que são idênticas às mutações da linha germinal observadas no V_L de qualquer um dos anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 152.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1;

5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; ou 5.59.1.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico codifica pelo menos três substituições de aminoácido em comparação com a sequência da linha germinal que são idênticas às mutações da linha germinal observadas no V_L de qualquer um dos anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 6.53.1; 5.56.1; 5.57.1; ou 5.59.1.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91 ou 126, que codifica a sequência de aminoácidos V_L de anticorpo monoclonal 1.12.1(M29I/D19A), 1.11.1, 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; 5.59.1 ou 1.12.1.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácido de uma das SEQ ID NOs: 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56; 60; 64; 68; 72, 76, 80, 84, 88 e 92 ou 127. Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico compreende a sequência do nucleótido da SEQ ID NO: 3 ou uma parte desta. Em algumas instâncias, o ácido nucleico codifica a sequência de aminoácido da cadeia luz de um, dois ou três CDRs do dito anticorpo. Em algumas instâncias, o dito porção codifica uma região contígua de CDR1-CDR3 da cadeia leve de um anticorpo anti-ALK-1.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácido V_L que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica à

sequência de aminoácido V_L de qualquer um dos anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1 ou 5.59.1, ou com a sequência de aminoácido da região V_L da SEQ ID NO: 4. As moléculas de ácido nucleico da divulgação incluem ácidos nucleicos que hibridam sob condições muito restritivas, tais como aquelas acima descritas, ou que são pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idênticas a um ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da região V_L da SEQ ID NOS: 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88 e 92 ou 126 ou a um ácido nucleico que compreende a sequência de nucleótidos da região V_L da SEQ ID NO: 4.

Em outras instâncias preferidas, a molécula de ácido nucleico codifica o domínio variável de uma cadeia pesada (V_H) que utiliza uma sequência genética V_H 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 ou V_H 4-59 humana ou uma sequência derivada desta. Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico utiliza um gene humano V_H 4-31, um gene DH6-19 e um gene humano JH4B.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácido que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11 mutações comparadas com a sequência de aminoácido da linha germinal dos genes V, D ou J humanos. Em algumas instâncias, as ditas mutações estão na região V_H. Em algumas instâncias, ditas mutações estão nas regiões de CDR.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência V_H que compreende uma ou mais mutações de aminoácido em comparação com a sequência V_H da linha germinal que são idênticas às mutações de aminoácido observadas no V_H de qualquer um dos anticorpos monoclonais

1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; ou 5.59.1. Em algumas instâncias, o ácido nucleico codifica pelo menos três mutações de aminoácido comparadas com as sequências da linha germinal que são idênticas a pelo menos três mutações de aminoácido observadas num dos anticorpos monoclonais listados acima.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 49, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, ou 103, que codifica a sequência de aminoácidos V_H do anticorpo monoclonal 1.12.1(M29I/D19A), 1.11.1, 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; 5.59.1 ou 1.12.1.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácido de uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90 ou 104. Em várias instâncias preferidas, a molécula de ácido nucleico compreende pelo menos uma parte da sequência de nucleótidos de SEQ ID NOS: 1 ou 95. Em algumas instâncias, a dita parte codifica a região V_H, uma região CDR3, todas as três regiões CDR, ou uma região contígua incluindo CDR1-CDR3.

Em algumas instâncias, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácido V_H que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 86%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica à sequência de aminoácido V_H em qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58,

62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90 ou 104. As moléculas de ácido nucleico da divulgação incluem ácidos nucleicos que hibridam sob condições muito restritivas, tais como aquelas acima descritas, ou que são pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idênticas a um ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido das SEQ ID NOs: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 100 ou 104, ou a uma região V_H desta, ou a um ácido nucleico que compreende a sequência de nucleótidos das SEQ ID NOs: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 95, 103, 128 ou 129, ou a sequência de nucleótidos que codifica uma região V_H desta.

Em outra instância, o ácido nucleico codifica uma cadeia pesada de comprimento total de um anticorpo selecionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M291/D19A); 1.12.1(M291); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1, ou uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2. Além disso, o ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleótidos das SEQ ID NOs: 1 ou 95.

Uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-ALK-1 ou suas porções pode ser isolada de qualquer fonte que produza tal anticorpo. Em várias instâncias, as moléculas de ácido nucleico são isoladas de uma célula B que expressa um anticorpo anti-ALK-1 isolado de um animal imunizado com ALK-1 ou de uma célula imortalizado derivada de uma tal célula B. Métodos de isolar ácidos nucleicos que codificam um anticorpo são bem conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N.I. (2000). O ARNm pode ser isolado e utilizado para produzir ADNc para utilização na reação de cadeia polimerase (PCR) ou clonagem de ADNc de genes de anticorpo. Numa instância preferida, a molécula de ácido nucleico é isolada de um hibridoma que possui como um de seus pares de fusão uma célula de um animal transgênico não humano, a dita célula produzindo uma imunoglobulina humana. Numa instância ainda mais preferida, a célula produtora de imunoglobulina humana é isolada de um animal XENOMOUSE®. Em outra instância, a célula produtora da imunoglobulina humana é isolada de um animal transgênico não humano, não ratinho, conforme descrito acima. Em outra instância, o ácido nucleico é isolado de um animal não humano, não transgênico. As moléculas de ácido nucleico isoladas de um animal não-humano, não transgênico podem ser usadas, por exemplo, para anticorpos humanizados que compreendem uma ou mais sequências de aminoácidos de um anticorpo anti-ALK-1 humano da presente divulgação.

Em algumas instâncias, um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação pode compreender uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio V_H da divulgação unida estruturalmente a uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio constante de cadeia pesada de qualquer fonte. Do mesmo modo, uma molécula ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação pode compreender uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio V_L da divulgação unida estruturalmente a uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio constante de cadeia leve de qualquer fonte.

Num outro aspecto da divulgação, as moléculas de ácido nucleico que codificam o domínio variável das cadeias pesadas (V_H) e/ou leves (V_L) são "convertidas" em genes de anticorpo de comprimento total. Numa instância, as moléculas de ácido nucleico que codificam os domínios V_H ou

V_L são convertidas em genes de anticorpo de comprimento total mediante a inserção numa expressão vetor que codifica anteriormente os domínios constantes de cadeia pesada (C_H) ou constantes de cadeia leve (C_L), respetivamente, de tal forma que o segmento V_H está operativamente ligado ao(s) segmento(s) C_H dentro do vetor, e/ou o segmento V_L está operativamente ligado ao segmento C_L dentro do vetor. Em outra instância, as moléculas de ácido nucleico que codificam os domínios V_H e/ou V_L são convertidas em genes de anticorpo de comprimento total através da união, por exemplo, ligação, de uma molécula de ácido nucleico que codifica um domínio V_H e/ou V_L a uma molécula de ácido nucleico que codifica um domínio C_H e/ou C_L usando técnicas biomoleculares padrão. As sequências de ácido nucleico de genes de domínio constante da imunoglobulina de cadeia pesada e leve são conhecidas na técnica. Veja-se, por exemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5^a Ed., NIH Publ. N° 91-3242, 1991. As moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias pesadas e/ou leves de comprimento total podem, então, ser expressas a partir de uma célula em que elas foram introduzidas e o anticorpo anti-ALK-1 isolado.

As moléculas de ácido nucleico podem ser usadas para recombinantemente expressar grandes quantidades de anticorpos anti-ALK-1. As moléculas de ácido nucleico também podem ser utilizadas para produzir anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos de cadeia única, imunoadesinas, diacorpos, anticorpos transformados e derivados de anticorpo, conforme descrito mais a seguir. Se as moléculas de ácido nucleico forem derivadas de um animal não humano, não transgénico, as moléculas de ácido nucleico podem ser utilizadas para a humanização de anticorpos, também como será descrito a seguir.

Em outra instância, uma molécula de ácido nucleico da divulgação é usada como uma sonda ou iniciador de PCR para

uma sequência de anticorpo específica. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser usado como uma sonda em métodos de diagnóstico ou como um iniciador de PCR para amplificar as regiões de ADN que podem ser utilizadas, entre outros, para isolar as moléculas de ácido nucleico adicionais que codificam os domínios variáveis de anticorpos anti-ALK-1. Em algumas instâncias, as moléculas de ácido nucleico são oligonucleótidos. Em algumas instâncias, os oligonucleótidos são domínios altamente variáveis das cadeias leves e pesadas do anticorpo de interesse. Em algumas instâncias, os oligonucleótidos codificam toda ou uma parte de um ou mais dos CDRs de anticorpos 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; ou 5.59.1 ou suas variantes conforme descrito no presente documento.

Vetores

A divulgação proporciona vetores que compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia pesada de um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo. A divulgação proporciona também vetores que compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve de tais anticorpos ou porção de ligação a antígeno dos mesmos. A divulgação proporciona ainda vetores que compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam as proteínas de fusão, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpo, e sondas destas.

Em algumas instâncias, os anticorpos anti-ALK-1 da divulgação ou porções de ligação a antígeno são expressos através da inserção de ADN que codificam as cadeias leves e pesadas de comprimento parcial ou total, obtidas conforme descrito acima, em vetores de expressão tais que os genes são operativamente ligados às necessárias sequências de

controle de expressão tais como as sequências de controle transcricionais e traducionais. Os vetores de expressão incluem plasmídeos, retrovírus, adenovírus, vírus associados com adeno (AAV), vírus de planta tais como o vírus mosaico da couve-flor, vírus do mosaico do tabaco, cosmídeos, YACs, epissomas derivados de EBV, e similares. O gene de anticorpo é ligado num vetor tal que as sequências de controle transcricionais e traducionais dentro do vetor servem à sua função destinada de regulação da transcrição e translação do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as sequências de controle da expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vetores separados. Numa instância preferida, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão por métodos padrão (por exemplo, ligação dos locais de restrição complementares sobre o fragmento genético de anticorpo e vetores, ou ligação final abrupta se nenhum local de restrição estiver presente).

Um vetor conveniente é aquele que codifica uma sequência de imunoglobulina C_H ou C_L humana funcionalmente completa, com os locais de restrição apropriados planejados de modo que qualquer sequência de V_H ou V_L possa facilmente ser inserida e expressa, conforme descrito acima. Em tais vetores, junção geralmente ocorre entre o local doador da junção na região J inserida e o local aceitante da junção precedendo o domínio C humano, e também nas regiões de junção que ocorrem dentro dos exões C_H humanos. O término da poliadenilação e transcrição ocorre nos locais cromossômicos nativos a jusante das regiões de codificação. O vetor de expressão recombinante também pode codificar um péptido de sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene da cadeia de

anticorpo pode ser clonado no vetor tal que o péptido de sinal esteja ligado estruturalmente ao amino terminal da cadeia de imunoglobulina. O péptido de sinal pode ser um péptido de sinal da imunoglobulina ou um péptido de sinal heterólogo (isto é, um péptido de sinal de uma proteína não imunoglobulina).

Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da divulgação transportam sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes da cadeia de anticorpo numa célula hospedeira. Será observado por aqueles versados na técnica que a concepção do vetor de expressão, incluindo a seleção das sequências reguladoras pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc. As sequências reguladoras preferidas para a expressão da célula hospedeira de mamíferos incluem elementos virais que direcionam os níveis elevados de expressão de proteína em células de mamífero, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tais como o promotor/intensificador CMV), Simian Virus 40 (SV40) (tais como o promotor/intensificador SV40), adenovírus, (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)), políoma e promotores de mamífero fortes tais como a imunoglobulina nativa e promotores de actina. Para outra descrição de elementos reguladores virais, e suas sequências, veja-se, por exemplo, a Patente US N° 5.168.062, Patente US N° 4.510.245 e Patente US N° 4.968.615. Métodos para expressar anticorpos em plantas, incluindo uma descrição dos promotores e vetores, assim como a transformação de plantas, são conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, a Patente US N° 6.517.529. Métodos de expressar polipéptidos em células bacterianas ou células fúngicas, por exemplo, células de levedura, também são bem conhecidos na técnica.

Além dos genes de cadeia de anticorpos e sequências reguladoras, os vetores de expressão recombinante da divulgação podem carregar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vetor nas células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras em que o vetor foi introduzido (veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 4.399.216, 4.634.665, 5.179.017). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência aos medicamentos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira em que o vetor foi introduzido. Por exemplo, os genes marcadores selecionáveis incluem o gene diidrofolato redutase (DHFR) (para utilização em células hospedeiras do dhfr com seleção/amplificação de metotrexato), o neo gene (para seleção G418), e o gene glutamato sintetase.

Células Hospedeiras de não Hibridomas e Métodos de Produzir Recombinantemente Proteína

As moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-ALK-1 e vetores que compreendem estas moléculas de ácido nucleico podem ser usadas para a transfeção de uma célula hospedeira adequada de mamífero, planta, bacteriana ou levedura. A transformação pode ser feita por qualquer método conhecido para a introdução de polinucleótidos numa célula hospedeira. Métodos para a introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamífero são bem conhecidos na técnica e incluem a transfeção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfeção mediada por polibreno, a fusão protoplástica, electroporação, encapsulamento do(s) polinucleótido(s) em lipossomas, e microinjeção direta do ADN em núcleos. Além disso, as moléculas de ácido nucleico podem ser introduzidas nas células de mamífero por vetores virais. Métodos de transformar células são bem conhecidos

na técnica. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 e 4.959.455). Métodos de transformar células vegetais são bem conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium*, transformação biolística, injeção direta, electroporação e transformação virai. Os métodos de transformar células bacterianas e de levedura também são bem conhecidos na técnica.

As linhas celulares de mamífero disponíveis como hospedeiros para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem muitas linhas celulares imortalizadas disponíveis da Coleção Americana de Culturas Celulares (ATCC). Estas incluem, entre outros, células do ovário de hamster chinês (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células 293 Freestyle (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células renais de hamster bebé (BHK), células renais do macaco verde africano (COS), células do carcinoma hepatocelular humanas (por exemplo, Hep G2), células A549, e várias outras linhas celulares. As linhas celulares de preferência particular são selecionadas através da determinação de quais linhas celulares possuem níveis de expressão elevados. Outras linhas celulares que podem ser utilizadas são linhas celulares de inseto, tais como células Sf9 ou Sf21. Quando os vetores de expressão recombinantes que codificam os genes de anticorpo forem introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos pelo cultivo das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para levar em conta a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir do meio de cultura, utilizando métodos de purificação de proteína padrão. As células hospedeiras de planta incluem, por exemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lentilha d'água, milho,

trigo, batata, etc. As células hospedeiras bacterianas incluem espécies *E. coli* e *Streptomyces*. As células hospedeiras de levedura incluem *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

Além disso, a expressão de anticorpos da divulgação a partir da produção de linhas celulares pode ser reforçada usando várias técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de expressão genética de sintetase de glutamina (o sistema GS) é uma abordagem comum para reforçar a expressão sob certas condições. O sistema GS é debatido no todo ou em parte em conexão com as Patentes Europeias N° 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997, 0 338 841.

É provável que os anticorpos expressos por diferentes linhas celulares ou em animais transgênicos terão diferentes glicosilação uns com os outros. No entanto, todos os anticorpos codificados pelas moléculas de ácido nucleico aqui fornecidas, ou que compreende as sequências de aminoácidos aqui fornecidas são parte da presente divulgação, independente da glicosilação dos anticorpos.

Animais e Plantas Transgênicas

Os anticorpos anti-ALK-1 da divulgação também podem ser produzidos transgenicamente através da geração de um mamífero ou planta que é transgênica com relação as sequências de cadeia pesada e leve da imunoglobulina de interesse e produção do anticorpo numa forma recuperável. Em conexão com a produção transgênica em mamíferos, os anticorpos anti-ALK-1 podem ser produzidos, e recuperados, no leite de cabras, vacas, ou de outros mamíferos. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172, 5.741.95.

Em algumas instâncias, os animais transgênicos não humanos que compreendem locais de imunoglobulina humana são imunizados com ALK-1 ou uma porção imunogénico desta, conforme descrito acima. Os métodos para a produção de anticorpos em plantas são descritos, por exemplo, nas

Patentes US N° 6.046.037 e 5.959.177.

Em algumas instâncias, os animais transgênicos não humanos ou plantas são produzidos através da introdução de uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação nos animais ou plantas mediante técnicas transgênicas padrão. Veja-se Hogan e Patente US N° 6.417.429, *supra*. As células transgênicas utilizadas para a produção de animais transgênicos podem ser células estaminais embrionárias ou células somáticas ou um óvulo fecundado. Os organismos não humanos transgênicos podem ser quiméricos, heterozigotos não quiméricos e homozigotos não quiméricos. Veja-se, por exemplo, Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2^a ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson *et al.*, *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); e Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*. Academic Press (1999). Em algumas instâncias, os animais transgênicos não humanos possuem uma rutura direcionada e substituição por um construção direcionado que codifica uma cadeia pesada e/ou uma cadeia leve de interesse. Numa instância preferida, os animais transgênicos compreendem e expressam as moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias pesadas e leves que se ligam especificamente à ALK-1, de preferência ALK-1 humana. Em algumas instâncias, os animais transgênicos compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam um anticorpo modificado tal como um anticorpo de cadeia única, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Os anticorpos anti-ALK-1 podem ser produzidos em qualquer animal transgênico. Numa instância preferida, os animais não humanos são ratinhos, ratos, ovinos, suínos, caprinos, bovinos e equinos. O animal transgênico não humano expressa ditos polipéptidos codificados no sangue, leite, urina, saliva, lágrima, muco e outros fluidos corporais.

Bibliotecas de Visualização em Fagos

A divulgação proporciona um método para produzir um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antígeno do mesmo que compreende as etapas de sintetizar uma biblioteca de anticorpos humanos em fago, fazer o rastreio da biblioteca com ALK-1 ou uma porção de ligação ao anticorpo destes, isolar o fago que se liga à ALK-1, e obter o anticorpo do fago. Por meio de exemplo, um método para preparar da biblioteca de anticorpos para utilização nas técnicas de apresentação em fagos (*phage display*) compreende as etapas de imunizar um animal não humano que compreende locais de imunoglobulina humana com ALK-1 ou uma porção antigénico deste para criar uma resposta imunológica, extraíndo as células produtoras de anticorpo do animal imunizado; isolar o ARN que codifica as cadeias leves e pesadas de anticorpos da divulgação da células extraídas, inverter transcrevendo o ARN para produzir ADNc, amplificar o ADNc utilizando iniciadores, e inserir o ADNc num vetor de apresentação em fagos tal que os anticorpos sejam expressos no fago. Os anticorpos anti-ALK-1 recombinantes da divulgação podem ser obtidos desta forma.

Os anticorpos anti-ALK-1 humanos recombinantes da divulgação podem ser isolados mediante o rastreio de uma biblioteca de anticorpo combinatória recombinante. Preferivelmente a biblioteca é uma biblioteca de apresentação em fagos scFv, gerada usando ADNc humanos V_L e V_H preparados a partir do ARNm isolado das células B. Métodos para a preparação e rastreio de tais bibliotecas são conhecidos na técnica. Kits para gerar bibliotecas de apresentação em fagos estão comercialmente disponíveis (por exemplo, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, N° de catálogo 27-9400-01; e o *kit* de apresentação em fagos Stratagene SurfZAP™, N° de catálogo 240612). Há também outros métodos e reagentes que podem ser utilizados na geração e rastreio das bibliotecas de visualização de anticorpos (veja-se, por exemplo, a Patente US N°

5.223.409; Publicações PCT N° WO 92/18619, documento WO 91/17271, documento WO 92/20791, documento WO 92/15679, documento WO 93/01288, documento WO 92/01047, documento WO 92/09690; Fuchs *et al.*, Bio/Technology 9:1370-1372 (1991); Hay *et al.*, Hum. Antibod. Hybridomas 3:81 85 (1992); Huse *et al.*, Science 246:1275 1281 (1989); McCafferty *et al.*, Nature 348:552 554 (1990); Griffiths *et al.*, EMBO J. 12:725 734 (1993); Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889 896 (1992); Clackson *et al.*, Nature 352:624 628 (1991); Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576 3580 (1992); Garrad *et al.*, Bio/Technology 9:1373 1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, Nuc. Acid Res. 19:4133 4137 (1991); e Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:7978 7982 (1991).

Numa instância, para isolar e produzir anticorpos anti-ALK-1 humanos com as características desejadas, um anticorpo anti-ALK-1 humano conforme descrito no presente documento é primeiro usado para selecionar as sequências de cadeia pesada e leve humanas tendo atividade de ligação similar em direção a ALK-1, usando os métodos de impressão de epítipo descritos na Publicação PCT N° WO 93/06213. As bibliotecas de anticorpo utilizadas neste método são preferivelmente bibliotecas scFv preparadas e submetidas ao rastreio conforme descrito na Publicação PCT N° WO 92/01047, McCafferty *et al.*, Nature 348:552 554 (1990); e Griffiths *et al.*, EMBO J. 12 : 725.734 (1993). As bibliotecas de anticorpo scFv preferivelmente são submetidas ao rastreio usando ALK-1 humana como o antígeno.

Assim que os domínios V_L e V_H humanos são selecionados, as experiências de "mistura e comparação" são realizadas, em que diferentes pares dos segmentos V_L e V_H inicialmente selecionados são submetidos o rastreio com relação a ligação de ALK-1 para selecionar as combinações de pares V_L/V_H preferida. Adicionalmente, para ainda melhorar a qualidade do anticorpo, os segmentos V_L e V_H

do(s) par(es) V_L/V_H preferido(s) podem ser aleatoriamente transformados, de preferência dentro da região CDR3 de V_H e/ou V_L , num processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável pela maturação por afinidade de anticorpos durante uma resposta imune natural. Esta maturação por afinidade *in vitro* pode ser executada pela amplificação dos domínios V_H e V_L usando iniciadores da PCR complementares ao V_H CDR3 ou V_L CDR3, respetivamente, cujos iniciadores foram "bloqueados" com uma mistura aleatória das quatro bases de nucleótido em certas posições tal que os produtos da PCR resultantes codificam os segmentos V_H e V_L em que as mutações aleatórias foram introduzidas nas regiões CDR3 V_H e/ou V_L . Estes segmentos V_H e V_L aleatoriamente transformados podem ser reexaminados com relação a ligação à ALK-1.

Após o rastreio e isolamento de um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação de uma biblioteca de apresentação de imunoglobulina recombinante, os ácidos nucleicos que codificam o anticorpo selecionado podem ser recuperados da "pacote de apresentação" (por exemplo, a partir do genoma fago) e subclonados em outros vetores de expressão por técnicas de ADN recombinantes padrão. Se desejado, o ácido nucleico pode ainda ser manipulado para criar outras formas de anticorpo da divulgação, como será descrito a seguir. Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado pelo rastreio de uma biblioteca combinatória, o ADN que codifica o anticorpo é clonado num vetor de expressão recombinante e introduzido numa célula hospedeira de mamífero, conforme descrito acima.

Anticorpos Desimunizados

Num outro aspeto da divulgação, o anticorpo pode ser desimmunizado para reduzir a sua imunogenicidade usando as técnicas descritas nas, por exemplo, Publicações PCT N° WO 98/52916 e WO 00/34317.

Anticorpos Mutados

Numa outra instância, as moléculas de ácido nucleico, vetores e células hospedeiras podem ser utilizadas para produzir anticorpos anti-ALK-1 mutados. Os anticorpos podem ser transformados nos domínios variáveis das cadeias pesadas e/ou leves, por exemplo, para alterar uma propriedade de ligação do anticorpo. Por exemplo, uma mutação pode ser feita numa ou mais das regiões de CDR para aumentar ou diminuir a K_D do anticorpo com relação a ALK-1, para aumento ou diminuir a k_{off} , ou alterar a especificidade de ligação do anticorpo. As técnicas na mutagênese direcionada ao local são bem conhecidas na técnica. Veja-se, por exemplo, Sambrook *et al* e Ausubel *et al*, *supra*. Em outra instância, uma ou mais mutações são feitas num resíduo de aminoácido que é conhecido por ser alterado, em comparação com a linha germinal no anticorpo monoclonal 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1 ou 5.59.1. As mutações podem ser feitas numa região de CDR ou região *framework* de um domínio variável, ou num domínio constante. Numa instância preferida, as mutações são feitas num domínio variável. Em algumas instâncias, uma ou mais mutações são feitas num resíduo de aminoácido que é conhecido por ser alterado em comparação com a linha germinal numa região de CDR ou região *framework* de um domínio variável de uma sequência de aminoácido SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92 ou 127, ou cuja sequência de ácido nucleico é apresentada na SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 95, 102 ou 126.

Em outra instância, a região *framework* é transformada de modo que a(s) região(ões) *framework* resultantes possui(em) a sequência de aminoácido do gene da linha germinal correspondente. Uma mutação pode ser feita numa região *framework* ou domínio constante para aumentar a meia-vida do anticorpo anti-ALK-1. Veja-se, por exemplo, a Publicação PCT N° WO 00/09560. Uma mutação numa região *framework* ou domínio constante também pode ser feita para alterar a imunogenicidade do anticorpo, para fornecer um local para a ligação covalente ou não covalente numa outra molécula, ou para alterar tais propriedades como fixação complementar, ligação de FcR e citotoxicidade mediada pela célula dependente de anticorpo (ADCC). De acordo com a divulgação, um único anticorpo pode ter mutações em qualquer um ou mais dos CDRs ou regiões *framework* do domínio variável ou no domínio constante.

Em algumas instâncias, existem de 1 a 13, incluindo qualquer número no intervalo, as mutações de aminoácido nos domínios V_H ou V_L do anticorpo anti-ALK-1 mutado em comparação com o anticorpo anti-ALK-1 antes da mutação. Em qualquer um do acima, as mutações podem ocorrer numa ou mais regiões de CDR. Além disso, qualquer uma das mutações podem ser substituições de aminoácido conservadoras. Em algumas instâncias, não há mais do que 5, 4, 3, 2, ou 1 mudança de aminoácido nos domínios constante.

Anticorpos Modificados

Em outra instância, um anticorpo de fusão ou imunoadesina podem ser produzidos o que compreende todo ou uma parte de um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação ligada a outro polipéptido. Numa instância preferida, apenas os domínios variáveis do anticorpo anti-ALK-1 são ligados ao polipéptido. Numa outra instância preferida, o domínio V_H de um anticorpo anti-ALK-1 é ligado a um primeiro polipéptido, enquanto o domínio V_L de um anticorpo anti-ALK-1 é ligada a um segundo polipéptido que se associa com

o primeiro polipéptido de uma maneira tal que os domínios V_H e V_L podem interagir um com o outro para formar um local de ligação a antigénio. Em outra instância preferida, o domínio V_H é separado do domínio V_L por um articulador tal que os domínios V_H e V_L podem interagir um com o outro (veja-se a seguir sob Anticorpos de Cadeia Única). O anticorpo V_H -ligante- V_L é depois ligado ao polipéptido de interesse. Além disso, os anticorpos de fusão podem ser criados em que dois (ou mais) anticorpos de cadeia única são ligados um ao outro. Isto é útil se alguém quiser criar um anticorpo divalente ou polivalente numa cadeia de polipéptido única, ou se alguém quiser criar um anticorpo biespecífico.

Para criar um anticorpo de cadeia única, (scFv), os fragmentos de ADN codificadores de V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um articulador flexível, por exemplo, que codifica a sequência de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, tal que as sequências de V_H e V_L podem ser expressas como uma proteína de cadeia única contígua, com os domínios V_L e V_H unidos pelo articulador flexível. Veja-se, por exemplo, Bird *et al.*, Science 242:423-426 (1988); Hustori *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990). Os anticorpos de cadeia única podem ser monovalentes, se apenas um V_H e V_L isolados for utilizado, bivalente, se dois V_H e V_L forem utilizados, ou polivalente, se mais do que dois V_H e V_L forem utilizados. Os anticorpos biespecíficos ou polivalentes podem ser gerados os quais se ligam especificamente à ALK-1 e a uma outra molécula.

Em outras instâncias, outros anticorpos modificados podem ser preparados utilizando anticorpo anti-ALK-1 que codifica as moléculas de ácido nucleico. Por exemplo, "Kappa bodies" (III *et al.*, Protein Eng. 10: 949-57 (1997)), "Minibodies" (Martin *et al.*, EMBO J. 13: 5303-9

(1994)), "Diabodies " (Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)), ou "Janusins" (Traunecker *et al.*, EMBO J. 10:3655-3659 (1991) e Traunecker *et al.*, Int. J. Cancer (Supl.) 7:51-52 (1992)) podem ser preparados usando técnicas biomoleculares padrão seguindo os ensinamentos da memória descritiva.

Os anticorpos biespecíficos ou fragmentos de ligação a antígeno podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo a fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja-se, por exemplo, Songsivilal & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). Além disso, os anticorpos biespecíficos podem ser formados como "diacorpos" ou "Janusins". Em algumas instâncias, o anticorpo biespecífico se liga a dois epítomos diferentes da ALK-1. Em algumas instâncias, o anticorpo biespecífico possui uma primeira cadeia pesada e uma primeira cadeia leve de anticorpo monoclonal 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1 (rWT); 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 4,10. 1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1 ou 5.59.1 e uma cadeia pesada e cadeia leve de anticorpo adicional. Em algumas instâncias, a cadeia leve e cadeia pesada adicionais também são de um dos anticorpos monoclonais identificados acima, mas são diferentes das primeiras cadeias pesadas e leves.

Em algumas instâncias, os anticorpos modificados acima descritos são preparados usando um ou mais dos domínios variáveis ou regiões de CDR de um anticorpo monoclonal anti-ALK-1 humano proporcionado no presente documento.

Anticorpos Derivatizados e Marcados

Um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antígeno da divulgação pode ser derivatizado ou vinculado à outra molécula (por exemplo, um outro péptido ou proteína). Em geral, os anticorpos ou porção do mesmo são

derivatizados tais que a ligação de ALK-1 não é afetada adversamente pela derivatização ou marcação. Consequentemente, os anticorpos e porções de anticorpo da divulgação destinam-se a incluir as formas tanto intactas quanto modificadas dos anticorpos anti ALK-1 humanos descritos no presente documento. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo da divulgação pode ser funcionalmente ligado (pelo acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outra maneira) a uma ou mais outras entidades moleculares, tais como um outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, um agente farmacêutico, e/ou uma proteína ou péptido que pode mediar a associação do anticorpo ou porção de anticorpo com outra molécula (tal como uma região de núcleo de estreptavidina ou cauda de polihistidina).

Um tipo de anticorpo derivatizado é produzido pela reticulação de dois ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, por exemplo, para criar anticorpos biespecíficos). Os reticuladores adequados incluem aqueles que são heterobifuncionais, tendo dois grupos distintamente reativos separados por um espaçador adequado (por exemplo, éster maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncionais (por exemplo, suberato de dissuccinimidilo). Tais ligantes estão disponíveis da Pierce Chemical Company, Rockford, II.

Outro tipo de anticorpo derivatizado é um anticorpo marcado. Os agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou porção de ligação a antígeno da divulgação pode ser derivatizado incluem compostos fluorescentes, incluindo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonilo, ficoeritrina, lantanídeos fosforoso e similares. Um anticorpo também pode ser marcado com enzimas que são úteis para a detecção, tais como peroxidase de rábano-silvestre,

β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase e similares. Quando um anticorpo for marcado com uma enzima detetável, é detetado mediante a adição de reagentes adicionais que a enzima usa para produzir um produto de reação que pode ser diferenciado. Por exemplo, quando o agente peroxidase de rábano-silvestre estiver presente, a adição de peróxido de hidrogénio e diaminobenzidina leva a um produto de reação colorido, que é detetável. Um anticorpo também pode ser marcado com biotina, e detetado através da medição indireta da ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo também pode ser marcado com um epítopo de polipéptido predeterminado por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zipper de leucina, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, marcadores de epítopo). Em algumas instâncias, os marcadores são ligados por subdivisões de espaçador de vários comprimentos para reduzir impedimento estérico potencial.

Um anticorpo anti-ALK-1 também pode ser derivatizado com um grupo químico tal como polietileno glicol (PEG), um grupo metilo ou etilo, ou um grupo de hidrato de carbono. Estes grupos são úteis para melhorar as características biológicas do anticorpo, por exemplo, para aumentar a meia-vida no soro.

Composições Farmacêuticas e Administração

Esta divulgação também se refere a uma composição farmacêutica para o tratamento das condições associadas com a angiogénese aumentada indesejável num mamífero, incluindo um ser humano, que compreende uma quantidade de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio, conforme descrito no presente documento, que é eficaz no tratamento de tais condições, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Os anticorpos e porções de ligação a antigénio da presente divulgação podem ser incorporados nas composições

farmacêuticas adequadas para administração a um indivíduo. Tipicamente, a composição farmacêutica compreende um anticorpo ou porção de ligação a antigénio da divulgação e um veículo farmaceuticamente aceitável. Como é utilizado no presente documento "veículo farmaceuticamente aceitável" significa qualquer um e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardo isotónicos e de absorção, e similares que são fisiologicamente compatíveis. Alguns exemplos de veículos farmaceuticamente aceitáveis são água, salina, salina tamponada de fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares, assim como suas combinações. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Exemplos adicionais de substâncias farmaceuticamente aceitáveis são agentes molhantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsificantes, conservantes ou tampões, que reforçam a validade ou eficácia do anticorpo.

As composições desta divulgação podem estar numa variedade de formas, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo planejado de administração e aplicação terapêutica. As composições preferidas típicas estão na forma de soluções injetáveis ou infusíveis, tais como composições semelhantes àquelas utilizadas para a imunização passiva dos seres humanos. O modo preferido de administração é parentérico (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Numa instância preferida, o anticorpo é administrado por infusão intravenosa ou injeção. Em outra instância preferida, o anticorpo é administrado por injeção

intramuscular ou subcutânea. As formulações injetáveis podem ser apresentadas na forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de múltiplas doses, com ou sem um conservante adicionado. As composições podem assumir tais formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes formuladores tais como agentes de suspensão, estabilizantes e/ou dispersantes. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água livre de pirogênio estéril, antes da sua utilização.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para concentração elevada de medicamento. As soluções estéreis injetáveis podem ser preparadas mediante a incorporação do anticorpo anti-ALK-1 na quantidade requerida num solvente adequado com uma ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, se requerido, seguidos pela esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas pela incorporação do composto ativo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básica e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação das soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento que produz um pó do ingrediente ativo acrescido de qualquer ingrediente desejado de uma solução anteriormente filtrada estéril deste. A própria fluidez de uma solução pode ser mantida, por exemplo, mediante a utilização de um revestimento tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de tensioativos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser realizada

mediante a inclusão na composição de um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos ou porções de anticorpo da presente divulgação podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a via/modo preferida de administração é subcutânea, intramuscular ou infusão intravenosa. Como será observado pelo artífice versado, a via e/ou modo de administração irá variar dependendo dos resultados desejados.

Em certas instâncias, as composições de anticorpo da presente divulgação podem ser preparadas com um veículo que protegerá o anticorpo contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Os polímeros biocompatíveis biodegradáveis podem ser utilizados, tais como acetato de etileno vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres, e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são geralmente conhecidos dos peritos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

Os compostos ativos adicionais também podem ser incorporados nas composições. Em certas instâncias, um anticorpo anti-ALK-1 inibidor da divulgação é co-formulado com e/ou coadministrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Estes agentes incluem, sem limitação, os anticorpos que se ligam a outros alvos, agentes antitumorais, agentes anti-angiogénese, inibidores da transdução de sinal, agentes antiproliferativos, agentes quimioterápicos, ou análogos de péptido que inibem a anti-ALK-1. Tais terapêuticas de combinação podem exigir dosagens mais baixas do anticorpo anti-ALK-1 inibidor assim

como os agentes coadministrados, evitando assim possíveis efeitos tóxicos ou complicações associadas com as várias monoterapêuticas.

Como observado acima, as composições da presente divulgação opcionalmente podem ainda compreender um antioxidante farmacologicamente aceitável além de um agente quelante. Os antioxidantes adequados incluem, mas não são limitados a eles, metionina, tiosulfato de sódio, catalase, e platina.

Por exemplo, a composição pode conter metionina numa concentração que varia de 1 mM a cerca de 100 mM, e em particular, é cerca de 27 mM. Por exemplo, uma formulação aquosa pode ser: 10 mg/ml de anticorpo anti-ALK-1, 20 mM de histidina, pH 5,5, 84 mg/ml de diidratado de trealose, 0,2 mg/ml de Polisorbato 80, 0,05 mg/ml de EDTA dissódico, 0,1 mg/ml de L-Metionina.

As composições da divulgação podem incluir uma "quantidade terapêuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno da divulgação. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade efetiva, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo ou porção de ligação a antígeno pode variar de acordo com fatores tais como o estado doentio, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo em extrair uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo ou porção de ligação a antígeno são anulados pelos efeitos terapêuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente,

visto que uma dose profilática é utilizada em indivíduos antes de ou num estágio mais precoce da doença, a quantidade profilaticamente eficaz pode ser menos do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a melhor resposta desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular as composições parentéricas na forma unitária de dosagem para a facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma farmacêutica unitária como é utilizado no presente documento refere-se às unidades fisicamente discretas, adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as formas farmacêuticas unitárias da divulgação é ditada pelas e diretamente dependente das características únicas do anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo e do efeito terapêutico ou profilático particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica de compor um tal anticorpo para o tratamento de sensibilidade nos indivíduos.

Um intervalo não limitativo exemplar para uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção de anticorpo da divulgação é de 0,025 a 50 mg/kg, mais preferivelmente de 0,1 a 50 mg/kg, mais preferivelmente de 0,1 a 25, 0,1 a 10 ou 0,1 a 3 mg/kg. Em algumas instâncias, uma formulação contém 5 mg/ml de anticorpo num tampão de 20 mM de citrato de sódio, pH 5,5, 140 mM de NaCl, e 0,2 mg/ml de polisorbato 80. Deve ser

observado que os valores de dosagem podem variar com o tipo e gravidade da condição a ser atenuada. Deve ser ainda compreendido que para qualquer indivíduo particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições, e que os intervalos de dosagem apresentados no presente documento são exemplares apenas e não são destinados a limitar o âmbito ou prática da composição reivindicada.

Um outro aspeto da presente divulgação presente divulgação proporciona *kits* que compreendem um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antigénio da divulgação ou uma composição que compreende um tal anticorpo ou porção. Um *kit* pode incluir, além do anticorpo ou composição, agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Um *kit* pode também incluir instruções para utilização num método de diagnóstico ou terapêutico. Numa instância preferida, o *kit* inclui o anticorpo ou uma composição que compreende-o e um agente de diagnóstico que pode ser usado num método descrito a seguir. Em outra instância preferida, o *kit* inclui o anticorpo ou uma composição que o compreende e um ou mais agentes terapêuticos que podem ser usados num método descrito a seguir.

Métodos Diagnósticos de Utilização

Os anticorpos anti-ALK-1 ou porções de ligação a antigénio dos mesmos podem ser utilizados nos métodos de diagnóstico para detetar ALK-1 numa amostra biológica *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, os anticorpos anti-ALK-1 podem ser usados num imunoensaio convencional, incluindo, sem limitação, um ELISA, um R1A, citometria de fluxo, imunoistoquímica do tecido, Western Blot ou imunoprecipitação. Os anticorpos anti-ALK-1 da divulgação podem ser usados para detetar ALK-1 de seres humanos. Os anticorpos anti-ALK-1 também podem ser usados para detetar

ALK-1 de outros primatas, por exemplo, macacos cinomolgos.

A divulgação proporciona um método para detecção de ALK-1 numa amostra biológica que compreende o contacto da amostra biológica com um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação e detecção do anticorpo ligado. Numa instância, o anticorpo anti-ALK-1 é diretamente marcado com uma etiqueta detetável. Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 (o primeiro anticorpo) é não marcado e um segundo anticorpo ou outra molécula que possa se ligar ao anticorpo anti-ALK-1 é marcado. Como é bem conhecido de uma pessoa de habilidade na técnica, um segundo anticorpo é escolhido o qual é capaz de especificamente se ligar nas espécies e classes particulares do primeiro anticorpo. Por exemplo, se o anticorpo anti-ALK-1 for uma IgG humano, então o anticorpo secundário pode ser uma IgG anti-humano. Outras moléculas que podem se ligar aos anticorpos incluem, sem limitação, Proteína A e Proteína G, ambas das quais são disponíveis comercialmente, por exemplo, da Pierce Chemical Co.

Marcadores adequados para o anticorpo-ou anticorpo secundário foram debatidos anteriormente, e incluem várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano-silvestre, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinaesterase; exemplos de complexos de grupo protético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Em outras instâncias, a ALK-1 pode ser analisada numa amostra biológica por um imunoensaio de concorrência

utilizando padrões de ALK-1 marcados com uma substância detetável e um anticorpo anti-ALK-1 não marcado. Neste ensaio, a amostra biológica, os padrões de ALK-1 marcados e o anticorpo anti-ALK-1 são combinados e a quantidade de padrão de ALK-1 marcado ligada ao anticorpo não marcado é determinada. A quantidade de ALK-1 na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de padrão de ALK-1 marcado ligado ao anticorpo anti-ALK-1.

Pode-se usar os imunoenaios divulgados acima para vários propósitos. Por exemplo, os anticorpos anti-ALK-1 podem ser utilizados para detetar ALK-1 nas células cultivadas. Numa instância preferida, os anticorpos anti-ALK-1 são utilizados para determinar a quantidade de ALK-1 produzida por células que foram tratadas com diversos compostos. Este método pode ser utilizado para identificar compostos que modulam os níveis de proteína ALK-1. De acordo com este método, uma amostra de células é tratada com um composto de teste por um período de tempo enquanto uma outra amostra é deixada sem tratamento. Se o nível total de ALK-1 tiver que ser medido, as células são submetidas a lise e o nível de ALK-1 total é medido através de um dos imunoenaios descritos acima. O nível total de ALK-1 nas células tratadas versus não tratadas é comparado para determinar o efeito do composto de teste.

Um imunoenasão preferido para medir os níveis de ALK-1 totais é a citometria de fluxo ou imunoistoquímica. Métodos tais como ELISA, RIA, citometria de fluxo, Western Blot, imunoistoquímica, marcação da superfície celular das proteínas da membrana integrais e imunoprecipitação são bem conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, *supra*. Além disso, os imunoenaios podem ser graduados para cima para o rastreio de produção elevada de modo a testar um grande número de compostos para ativação ou inibição da expressão de ALK-1.

Os anticorpos anti-ALK-1 da divulgação também podem

ser usados para determinar os níveis de ALK-1 num tecido ou em células derivadas do tecido. Em algumas instâncias, o tecido é um tecido doente. Em algumas instâncias do método, um tecido ou uma biópsia deste é extirpado de um paciente. O tecido ou biópsia é depois usado num imunoensaio para determinar, por exemplo, os níveis de ALK-1 totais ou localização de ALK-1 pelos métodos debatidos acima.

Os anticorpos da presente divulgação presente divulgação também podem ser usados *in vivo* para identificar os tecidos e órgãos que expressam ALK-1. Uma vantagem de utilizar os anticorpos anti-ALK-1 humanos da presente divulgação presente divulgação é que eles podem ser usados com segurança *in vivo* sem obter uma resposta imune substancial para o anticorpo após a administração, ao contrário dos anticorpos de origem não humana ou com anticorpos humanizados ou quiméricos.

O método compreende as etapas de administração de um anticorpo anti-ALK-1 detetavelmente marcado ou uma composição que o compreende a um paciente com necessidade de um tal teste de diagnóstico e submetendo o paciente à análise de imagem para determinar a localização dos tecidos que expressam a ALK-1. A análise da formação de imagem é bem conhecida na técnica médica, e inclui, sem limitação, análise de raio-x, formação de imagem por ressonância magnética (MRI) ou tomografia computadorizada (CT). O anticorpo pode ser marcado com qualquer agente adequado para a formação de imagem *in vivo*, por exemplo, um agente de contraste, tal como o bário, que pode ser utilizado para análise de raio-x, ou um agente de contraste magnético, tal como um quelato gadolínio, que pode ser usado para a MRI ou CT. Outros agentes de marcação incluem, sem limitação, radioisótopos, tais como ^{99}Tc . Em outra instância, o anticorpo anti-ALK-1 será não marcado e será digitalizado pela administração de um segundo anticorpo ou outra molécula que seja detetável e que possa se ligar ao

anticorpo anti-ALK-1. Numa instância, uma biópsia é obtido do paciente para determinar se o tecido de interesse expressa ALK-1.

Métodos Terapêuticos de Utilização

Em outra instância, a divulgação proporciona um método para inibir a atividade de ALK-1 mediante a administração de um anticorpo anti-ALK-1 a um paciente em necessidade do mesmo. Qualquer um dos anticorpos ou porções de ligação a antígeno dos mesmos descritos no presente documento pode ser utilizado terapêuticamente. Numa instância preferida, o anticorpo anti-ALK-1 é um anticorpo quimérico ou humanizado de ser humano. Em outra instância preferida, o anticorpo anti-ALK-1 é anticorpo humano, e o paciente é um paciente humano. Alternativamente, o paciente pode ser um mamífero que exprime ALK-1 em que o anticorpo anti-ALK-1 inter-reage com ele. O anticorpo pode ser administrado a um mamífero não-humano que expressa a ALK-1 com o qual o anticorpo inter-reage (por exemplo, um macaco cinamolgo) para fins veterinários ou como um modelo animal de doenças humanas. Tais modelos animais podem ser úteis para a avaliação da eficácia terapêutica de anticorpos desta divulgação.

Numa outra instância, um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de anticorpo pode ser administrado a um paciente que expressa indevidamente níveis elevados de ALK-1. O anticorpo pode ser administrado uma vez, mas mais preferivelmente é administrado várias vezes. O anticorpo pode ser administrado a partir de três vezes ao dia a uma vez a cada seis meses ou mais. A administração pode ser num plano tal como três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses e uma vez a cada seis meses. O anticorpo também pode ser administrado continuamente através de uma minibomba. O anticorpo pode ser administrado através de uma

via mucosa, bucal, intranasal, inalável, intravenosa, subcutânea, intramuscular, parentérica, ou intratumoral. O anticorpo pode ser administrado uma vez, pelo menos duas vezes ou durante pelo menos o período de tempo até que a condição esteja tratada, mitigada ou curada. O anticorpo geralmente será administrado durante tanto tempo quanto a condição estiver presente. O anticorpo será geralmente administrado como parte de uma composição farmacêutica conforme descrito *supra*. A dosagem de anticorpo geralmente será no intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, mais preferivelmente de 0,5 a 50 mg/kg, mais preferivelmente de 1 a 20 mg/kg, e ainda mais preferivelmente de 1 a 10 mg/kg. A concentração de soro do anticorpo pode ser medida por qualquer método conhecido na técnica.

Numa instância, o anticorpo é administrado numa formulação como uma solução aquosa estéril que tem um pH que varia de cerca de 5,0 a cerca de 6,5 e que compreende de cerca de 1 mg/ml a cerca de 200 mg/ml de anticorpos, de cerca de 1 a cerca de 100 milimolares de tampão de histidina, de cerca de 0,01 mg/ml a cerca de 10 mg/ml de polisorbato 80, de cerca de 100 milimolar a cerca de 400 milimolar de trealose, e de cerca de 0,01 milimolar a cerca de 1,0 milimolar de dihidrato de EDTA dissódico.

Além disso, é contemplado pela presente divulgação que qualquer uma das composições aqui pode ser administrada a um paciente suscetível ou sofrendo de uma condição associada com o aumento da angiogénese ("uma condição angiogénica").

Exemplos de condições angiogénicas que podem ser tratadas/prevenidas pelas composições/métodos da presente divulgação incluem, mas não são limitados a eles, cancro (tanto sólido quanto hematológico), degeneração macular relacionada à idade (AMC), anomalias de desenvolvimento (organogénese), cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase, artrite reumatoide (RA)

e descolorações da pele (por exemplo, hemangioma, nevo flâmneo ou nevo simples).

Por exemplo, a presente divulgação refere-se aos métodos para o tratamento ou prevenção das condições associadas com a neovascularização ocular utilizando qualquer uma das composições/métodos aqui contidas. As condições associadas com a neovascularização ocular incluem, mas não estão limitadas a elas, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada com a idade ("ARMD"), glaucoma rubeótica, queratite intersticial, retinopatia da prematuridade, retinopatia isquêmica (por exemplo, célula falciforme), miopia patológica, histoplasmose ocular, pterigia, coroidopatia interna puniciada, e similares. Tratamento do Crescimento Celular Anormal

Esta divulgação também se refere a um método para o tratamento de crescimento celular anormal num mamífero, incluindo um ser humano, que compreende a administração a dito mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antigénio do mesmo, conforme descrito no presente documento, que é eficaz no tratamento do crescimento celular anormal.

Numa instância deste método, o crescimento celular anormal é cancro, incluindo, mas não limitado a eles, mesotelioma, hepatobiliar (ducto hepático e biliar), um tumor do CNS primário ou secundário, um tumor cerebral primário ou secundário, cancro do pulmão (NSCLC e SCLC), cancro dos ossos, cancro pancreático, cancro da pele, cancro da cabeça ou pescoço, melanoma cutâneo ou ocular, cancro do ovário, cancro do cólon, cancro rectal, cancro da região anal, cancro do estômago, gastrointestinal (estômago, colorretal e duodenal), cancro da mama, cancro do útero, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, Doença de Hodgkin, cancro do

esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino, cancro da tireoide, cancro da glândula paratireoide, cancro da glândula adrenal, sarcoma do tecido macio, cancro da uretra, cancro do pênis, cancro da próstata, cancro testicular, leucemia aguda ou crónica, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cancro da bexiga, o cancro do rim ou ureter, carcinoma de células renais, carcinoma da bacia renal, neoplasias do sistema nervoso central (CNS), linfoma primário CNS, linfoma de não Hodgkin, tumores do eixo espinhal, glioma do tronco cerebral, adenoma pituitário, cancro adrenocortical, cancro da vesícula biliar, mieloma múltiplo, colangiocarcinoma, fibrossarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, ou uma combinação de um ou mais dos cancros precedentes.

Numa instância preferida da presente divulgação presente divulgação o cancro é selecionado do cancro de pulmão (NSCLC e SCLC), cancro da cabeça ou pescoço, cancro do ovário, cancro do cólon, cancro rectal, cancro da região anal, cancro do estômago, cancro da mama, cancro do rim ou ureter, carcinoma das células renais, carcinoma da bacia renal, neoplasias do sistema nervoso central (CNS), linfoma primário do CNS, linfoma de não Hodgkin, tumores do eixo espinhal, ou uma combinação de um ou mais dos cancros precedentes.

Numa outra instância preferida da presente divulgação presente divulgação o cancro é selecionado de cancro de pulmão (NSCLC e SCLC), cancro do ovário, cancro do cólon, cancro rectal, cancro da região anal, ou uma combinação de um ou mais dos cancros precedentes.

Em outra instância do dito método, o dito crescimento celular anormal é uma doença proliferativa benigna, incluindo, mas não limitado a eles, psoríase, hipertrofia benigna da próstata ou restinose.

Esta divulgação também se refere a um método para o tratamento de crescimento celular anormal num mamífero que

compreende a administração a dito mamífero de uma quantidade de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio, conforme descrito no presente documento, que é eficaz no tratamento do crescimento celular anormal em combinação com um agente antitumoral selecionado a partir do grupo consistindo em inibidores da mitose, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos de intercalação, inibidores do fator de crescimento, inibidores do ciclo celular, enzimas, inibidores da topoisomerase, modificadores da resposta biológica, anticorpos, citotóxicos, antihormonal e anti-androgénio.

A divulgação também se refere a uma composição farmacêutica para o tratamento do crescimento celular anormal num mamífero, incluindo um ser humano, que compreende uma quantidade de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio, conforme descrito no presente documento, que é eficaz no tratamento do crescimento celular anormal em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável e um agente antitumoral selecionado a partir do grupo consistindo em inibidores da mitose, agentes alquilantes, anti-metabólitos, antibióticos de intercalação, inibidores do fator de crescimento, inibidores do ciclo celular, enzimas, inibidores da topoisomerase, modificadores da resposta biológica, antihormonal e anti-androgénio.

A divulgação também se refere a um método para o tratamento de um distúrbio hiperproliferativo num mamífero que compreende a administração em dito mamífero de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio, conforme descrito no presente documento, em combinação com um agente antitumoral selecionado a partir do grupo consistindo em agentes antiproliferativos, inibidores da cinase, inibidores da angiogénese, inibidores do fator de crescimento, inibidores de cox-1, II inibidores de cox-11,

inibidores da mitose, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos de intercalação, inibidores do fator de crescimento, radiação, inibidores do ciclo celular, enzimas, inibidores da topoisomerase, modificadores da resposta biológica, anticorpos, citotóxicos, antihormonal, estatinas e anti-androgénio.

Numa instância da presente divulgação o agente antitumoral utilizado em conjunto com um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio, e composições farmacêuticas descritas no presente documento, é um agente anti-angiogénese, inibidor da mistura cinase ou inibidor do fator de crescimento. Os inibidores da mistura cinase preferidos incluem Sutent (Pfizer Inc., SU-11248), descrito na Patente US N° 6.573.293 (Pfizer, Inc, NY, EUA).

Os agentes anti-angiogénese incluem, mas não estão limitados a eles, os seguintes agentes, tais como inibidor da EGF, inibidores da EGFR, inibidores do VEGF, inibidores do VEGFR, inibidores de TIE2, inibidores de IGF1R, inibidores da COX-II (ciclooxigenase II), inibidores de MMP-2 (matriz-metaloproteinase 2) e inibidores de MMP-9 (matriz-metaloproteinase 9). Os inibidores do VEGF preferidos incluem, por exemplo, Avastin (bevacizumab), um anticorpo monoclonal anti-VEGF da Genentech, Inc. of South San Francisco, Califórnia.

Os inibidores do VEGF adicionais incluem CP-547.632 (Pfizer Inc., NY, EUA), Axitinib (Pfizer Inc.; AG-013736), ZD-6474 (AstraZeneca), AEE788 (Novartis), AZD-2171, VEGF Trap (Regeneron/Aventis), Vatalanib (também conhecido como PTK-787, ZK-222584: Novartis & Schering AG), Macugen (pegaptanib octassódio, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech), IM862 (Cytran Inc, of kirkland, Washington, EUA); e angiozima, uma ribozima sintética da Ribozyme (Boulder, Colorado) e Chiron (Emeryville, Califórnia) e combinações dos mesmos. Os inibidores do VEGF úteis na prática da presente divulgação são divulgados nas

Patentes US N° 6.534.524 e 6.235.764, ambas das quais são incorporadas na íntegra para todos os propósitos. Os inibidores do VEGF particularmente preferido incluem CP-547632, AG 13736, Vatalanib, Macugen e combinações dos mesmos.

Os inibidores do VEGF adicionais são descritos, por exemplo, no documento WO 99/24440 (publicado em 20 de Maio de 1999), documento WO 1999/062890 (publicado em 9 de Dezembro de 1999), no documento WO 95/21613 (publicado em 17 de agosto de 1995), documento WO 99/61422 (publicado em 2 de Dezembro de 1999), Patente dos Estados Unidos 6.534.524 (divulga AG 13736), Patente dos Estados Unidos 5.834.504 (concedida em 10 de Novembro de 1998), documento WO 98/50356 (publicado em 12 de Novembro de 1998), Patente dos Estados Unidos 5.883.113 (concedida em 16 de março de 1999), Patente dos Estados Unidos 5.886.020 (concedida em 23 de março de 1999), Patente dos Estados Unidos 5.792.783 (concedida em 11 de Agosto de 1998), Patente US N° 6.653.308 (concedida em 25 de Novembro de 2003), documento WO 99/10349 (publicado em 4 de Março de 1999), documento WO 97/32856 (publicado em 12 de Setembro de 1997), documento WO 97/22596 (publicado em 26 de Junho de 1997), documento WO 98/54093 (publicado em 3 de Dezembro de 1998), documento WO 98/02438 (Publicado em 22 de Janeiro de 1998), documento WO 99/16755 (publicado em 8 de Abril de 1999) e documento WO 98/02437 (publicado em 22 de Janeiro de 1998).

Outros agentes antiproliferativos que podem ser usados com os anticorpos, ou suas porções de ligação a antigénio, da presente divulgação incluem inibidores da enzima farnesil proteína transferase e inibidores do recetor tirosina cinases PDGFr, incluindo os compostos divulgados e reivindicados nas seguintes Patentes dos Estados Unidos N° 6.080.769; 6.194.438; 6.258.824; 6.586.447; 6.071.935; 6.495.564; e 6.150.377.

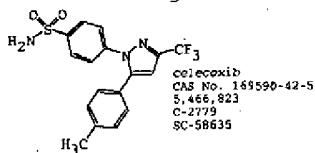
Para os inibidores de PDGRR adicionais, veja-se o

documento W001/40217, publicado em 7 de Julho de 2001 e documento WO 2004/020431, publicado em 11 de Março de 2004. Os inibidores de PDGFr preferidos incluem CP-868,596 da Pfizer e seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

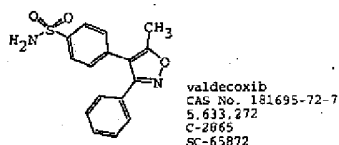
Os inibidores GARE preferidos incluem AG-2037 da Pfizer (pelitrexol e seus sais farmaceuticamente aceitáveis). Os inibidores GARE úteis na prática da presente divulgação são divulgadas na Patente US N° 5.608.082.

Exemplos de inibidores da COX-II úteis, que podem ser usados em conjunto com um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antígeno, conforme descrito no presente documento, e as composições farmacêuticas descritas no presente documento incluem CELEBREX™ (celecoxib), parecoxib, deracoxib, ABT-963, MK-663 (etoricoxib), COX-189 (lumiracoxib), BMS 347070, RS 57067, NS-398, Bextra (valdecoxib), paracoxib, Vioxx (rofecoxib), SD-8381, 4-metil-2-(3,4-Dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol, 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfa-moilfenil)-1H-pirrol, T-614, JTE-522, S-2474, SVT-2016, CT-3, SC-58125 e Arcoxia (etoricoxib). Para os inibidores da COX-II adicionais, veja-se Publicações de Pedido de Patente US N° 2005-0148627 e 2005-0148777.

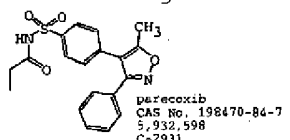
Numa instância preferida o agente antitumoral é celecoxib, veja-se Patente US N° 5.466.823. A estrutura para Celecoxib é mostrada a seguir:



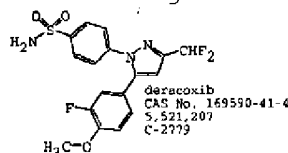
Numa instância preferida do agente antitumoral é valecoxib, veja-se Patente US N° 5.633.272. A estrutura para o valdecoxib é mostrada a seguir:



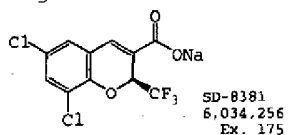
Numa instância preferida do agente antitumoral é parecoxib, veja-se Patente US N° 5.932.598. A estrutura para parecoxib é mostrada a seguir:



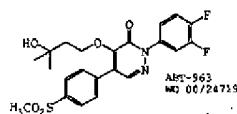
Numa instância preferida do agente antitumoral é deracoxib, veja-se Patente US N° 5.521.207. A estrutura para deracoxib é mostrada a seguir:



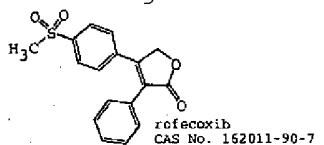
Numa instância preferida do agente antitumoral é SD-8381, veja-se Patente US N° 6.034.256. A estrutura para o DS-8381 é mostrada a seguir:



Numa instância preferida do agente antitumoral é ABT-963, veja-se Publicação Internacional Número WO 2002/24719. A estrutura para ABT-963 é mostrada a seguir:



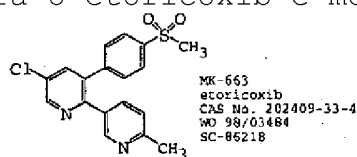
Numa instância preferida do agente antitumoral é rofecoxib como mostrado a seguir:



Numa instância preferida do agente antitumoral é MK-663 (etoricoxib), veja-se Publicação Internacional Número

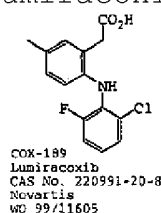
WO 1998/03484.

A estrutura para o etoricoxib é mostrada a seguir:

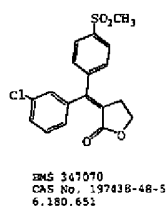


Numa instância preferida do agente antitumoral é COX-189 (lumiracoxib), veja-se Publicação Internacional Número WO 1999/11605.

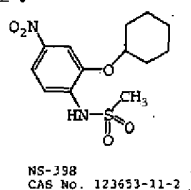
A estrutura para o lumiracoxib é mostrada a seguir:



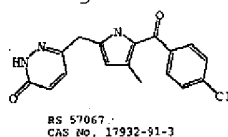
Numa instância preferida do agente antitumoral é BMS-347070, veja-se Patente dos Estados Unidos N° 6.180.651. A estrutura de BMS-347070 é mostrada a seguir:



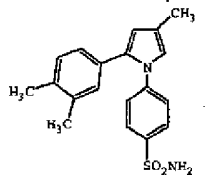
Numa instância preferida do agente antitumoral é NS-398 (CAS 123653-11-2). A estrutura para NS-398 (CAS 123653-11-2) é mostrada a seguir:



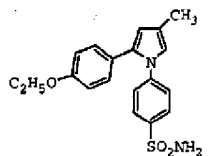
Numa instância preferida do agente antitumoral é RS 57067 (CAS 17932-91-3). A estrutura para RS-57067 (CAS 17932-91-3) é mostrada a seguir:



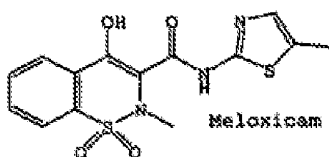
Numa instância preferida do agente antitumoral é de 4-metil-2-(3,4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol. A estrutura de 4-metil-2-(3,4-dimetilfenil)-1-(4-sulfamoil-fenil)-1H-pirrol é mostrada a seguir:



Numa instância preferida do agente antitumoral é 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1H-pirrol. A estrutura para 2-(4-Etoxifenil)-4-metil-1-(4-sulfamoilfenil)-1 H-pirrol é mostrada a seguir:



Numa instância preferida do agente antitumoral é meloxicam. A estrutura de meloxicam é mostrada a seguir:



Outros inibidores úteis como agentes antitumorais utilizados em conjunto com os anticorpos da presente divulgação presente divulgação e composições farmacêuticas descritas no presente documento incluem aspirina, e medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINE), que inibem a enzima que produz prostaglandinas (ciclooxigenase I e II), resultando em níveis mais baixos de prostaglandinas, incluem, mas não são limitados aos seguintes, Salsalato (Amigesic), Diflunisal (Dolobid), Ibuprofeno (Motrin), Cetoprofeno (Orudis), Nabumetona (Relafen), Piroxicam (Feldene), Naproxen (Aleve, Naprosyn), Diclofenac (Voltaren), Indometacina (Indocin), Sulindac (Clinoril), Tolmetina (Tolectin), Etodolac (Lodine), Ketorolac (Toradol), Oxaprozin (Daypro) e combinações dos

mesmos. Os inibidores da COX-I preferidos incluem ibuprofeno (Motrin), nuprina, naproxeno (Aleve), indometacina (Indocin), nabumetona (Relafen) e combinações dos mesmos.

Os agentes direcionados usados em conjunto com um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio, conforme descrito no presente documento, e composições farmacêuticas destes conforme descrito no presente documento, incluem inibidores de EGFr tais como Iressa (gefitinib, AstraZeneca), Tarceva (erlotinib ou OSI-774, OSI Pharmaceuticals Inc.), Erbitux (cetuximab, Imclone Pharmaceuticals, Inc.), EMD-7200 (Merck AG), ABX-EGF (Amgen Inc. e Abgenix Inc.), HR3 (Governo cubano), anticorpos IgA (University of Erlangen-Nuremberg), TP-38 (IVAX), proteína de fusão EGFR, vacina EGF, imunolipossomas anti-EGFr (Hermes Biosciences Inc.) e combinações dos mesmos.

Os inibidores de EGFr preferidos incluem Iressa, Erbitux, Tarceva e combinações dos mesmos.

A presente divulgação também tem a ver com agentes antitumorais selecionados entre os inibidores do recetor de mistura erb ou inibidores do recetor de ErbB2, tais como CP-724.714 (Pfizer, Inc.), CI-1033 (canertinib, Pfizer, Inc.), Herceptina (trastuzumab, Genentech Inc.), Omitarg (204, pertuzumab, Genentech Inc.), TAK-165 (Takeda), GW-572016 (lonafarnib, GlaxoSmithKline), GW-282974 (GlaxoSmithKline), EKB-569 (Wyeth), PKI-166 (Novartis), dHER2 (HER2 Vaccine, Corixa e GlaxoSmithKline), APC8024 (HER2 Vaccine, Dendreon), anticorpo biespecífico anti-HER2/neu (Decof Cancer Center), B7.her2.fgG3 (Agensys), AS HER2 (Research Institute for Rad Biology & Medicine), anticorpos biespecíficos bifuncionais (University of Munich) e mAB AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc) e mAB 2B-1 (Chiron) e combinações dos mesmos. Os agentes antitumorais seletivos erb preferidos incluem Herceptina, TAK-165, CP-724714, ABX-EGF, HER3 e combinações dos mesmos.

Os inibidores recetor da mistura erbb preferidos incluem GW572016, Cl-1033, EKB-569 e Omitarg e combinações dos mesmos.

Os inibidores erbb2 adicionais incluem aqueles no documento WO 98/02434 (publicado em 22 de Janeiro de 1998), documento WO 99/35146 (publicado em 15 de Julho de 1999), documento WO 99/35132 (publicado em 15 de Julho de 1999), documento WO 98/02437 (publicado em 22 de Janeiro de 1998), documento WO 97/13760 (publicado em 17 de Abril de 1997), documento WO 95/19970 (publicado em 27 de Julho de 1995), Patente dos Estados Unidos 5.587.458 (concedida em 24 de Dezembro de 1996), e Patente dos Estados Unidos 5.877.305 (concedida em 2 de Março de 1999), cada uma das quais é aqui incorporada por referência na sua totalidade. Para inibidores do recetor de Erbb2 adicionais úteis na presente divulgação, veja-se Patente dos Estados Unidos N° 6.465.449, 6.284.764, e Pedido Internacional N° WO 2001/98277.

Adicionalmente, outros agentes antitumorais podem ser seleccionados dos seguintes agentes, Sorafenib (Onyx Pharmaceuticals Inc.; BAY-43-9006), Genasense (augmerosen, Genta), Panitumumab (Abgenix/Amgen), Zevalin (Schering), Bexxar (Corixa/GlaxoSmithKline), Abarelix, Alimta, EPO 906 (Novartis), discodermolide (XAA-296), ABT-510 (Abbott), Neovastat (Aeterna), enzastaurino (Eli Lilly), Combrestatin A4P (Oxigene), ZD-6126 (AstraZeneca), flavopiridol (Aventis), CYC-202 (Cyclacel), AVE-8062 (Aventis), DMXAA (Roche/Antisoma), Thymitaq (Eximias), Temodar (temozolomida, Schering Plough) e Revilimd (Celegene) e combinações dos mesmos.

Outros agentes antitumorais podem ser seleccionados dos seguintes agentes, CyPat (acetato de ciproterona), Histerelina (acetato de histrelina), Plenaixis (depósito abarellx), Atrasentan (ABT-627), Satraplatin (JM-216), talomide (talidomida), Theratope, Temilifene (DPPE), ABI-

007 (paclitaxel), Evista (raloxifeno), Atamestano (Biomed-777), Xyotax (poliglutamato paclitaxel), Targetin (bexarotina) e combinações dos mesmos.

Adicionalmente, outros agentes antitumorais podem ser selecionados dos seguintes agentes, Trizaona (tirapazamina), Aposyn (exisulind), Nevastat (AE-941), Ceplene (dicloridrato de histamina), Orathecin (rubitecan), Virulizin, Gastrimmune (G17DT), DX-8951f (mesilato de exatecan), Onconase (rampirase), BEC2 (mitumoab), Xcytrin (motexafin gadolínio) e combinações dos mesmos.

Outros agentes antitumorais podem ser selecionados dos seguintes agentes, CeaVac (CEA), NeuTrexin (glucuronato de trimetresato) e combinações dos mesmos. Os agentes antitumorais adicionais podem ser selecionados a partir dos seguintes agentes, OvaRex (oregovomab), Osidem (IDM-1), e combinações dos mesmos. Os agentes antitumorais adicionais podem ser selecionados dos seguintes agentes, Advexin (ING 201), Tirazona (tirapazamina), e combinações dos mesmos. Os agentes antitumorais adicionais podem ser selecionados dos seguintes agentes, RSR13 (efaproxiral), Cotara (1311 chTNT 1/b), NBI-3001 (IL-4) e suas combinações. Os agentes antitumorais adicionais podem ser selecionados dos seguintes agentes, Canvaxin, vacina GMK, PEG Interon A, Taxoprexin (DHA/paciltaxel) e combinações dos mesmos. Outros agentes antitumorais preferidos incluem inibidor MEK1/2 da Pfizer PD325901, inibidor MEK da Array Biopharm ARRY-142886, inibidor CDK2 da Bristol Myers BMS-387032, inibidor CDK da Pfizer PD0332991 e AXD-5438 da AstraZeneca e combinações dos mesmos. Adicionalmente, os inibidores mTOR também podem ser utilizados tais como CCI-779 (Wyeth) e derivados de rapamicina RAD001 (Novartis) e AP-23573 (Ariad), inibidores HDAC SAHA (Merck Inc./Aton Pharmaceuticals) e suas combinações. Os agentes antitumorais adicionais incluem inibidor aurora 2 VX-680 (Vertex), inibidor Chk1/2 XL844

(Exilixis).

Os seguintes agentes citotóxicos, por exemplo, um ou mais selecionados do grupo consistindo em epirubicina (Ellence), docetaxel (Taxotere), paclitaxel, Zinecard (dexrazoxane), rituximab (Rituxan), mesilato de imatinib (Gleevec), e combinações dos mesmos, podem ser utilizados em conjunto com um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antígeno, conforme descrito no presente documento, e composições farmacêuticas, conforme descrito no presente documento.

A divulgação também contempla a utilização dos anticorpos e suas porções de ligação a antígeno da presente divulgação juntamente com terapêutica hormonal, incluindo, mas não limitado a eles, exemestano (Aromasin, Pfizer Inc.), leuprorelina (Lupron ou Leuplin, TAP/Abbott/Takeda), anastrozol (Arimidex, AstraZeneca), gosrelina (Zoladex, AstraZeneca), doxercalciferol, fadrozol, formestano, citrato de tamoxifeno (tamoxifeno, Nolvadex, AstraZeneca), Casodex (AstraZeneca), Abarelix (Praecis), Trelstar, e combinações dos mesmos.

A divulgação também refere-se aos agentes de terapêutica hormonal tais como anti-estrogênios incluindo, mas não limitado a fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, lasofoxifeno, letrozol (Femara, Novartis), anti-androgênio, como bicalutamida, flutamida, mifepristona, nilutamida, Casodex® (4'-ciano-3-(4-fluorofenilsulfonil)-2-hidroxi-2-metil-3'-(trifluorometil) propionanilida, bicalutamida) e combinações dos mesmos.

Além disso, a divulgação proporciona anticorpos da presente divulgação isoladamente ou em combinação com um ou mais produtos de cuidados de suporte, por exemplo, um produto selecionado a partir do grupo consistindo em Filgrastim (Neupogen), ondansetron (Zofran), Fragmin, Procrit, Aloxi, Emend, ou suas combinações.

Os agentes citotóxicos particularmente preferidos

incluem Camptosar, Erbitux, Iressa, Gleevec, Taxotere e combinações dos mesmos.

Os seguintes inibidores da topoisomerase I podem ser utilizados como agentes antitumorais camptotecina, irinotecan HCl (Camptosar), edotecarin, oratecina (Supergen), exatecan (Daiichi), BN-80915 (Roche) e combinações dos mesmos. Os inibidores da topoisomerase II particularmente preferidos incluem epirubicina (Ellence).

Os anticorpos da divulgação podem ser utilizados com agentes antitumorais, agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos, agentes anti-tumor derivados de plantas, derivados de camptotecina, inibidores da tirosina cinase, outros anticorpos, interferões, e/ou modificadores da resposta biológica.

Agentes alquilantes incluem, mas não são limitados a, N-óxido de nitrogénio mostarda, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano, busulfan, mitobronitol, carboquone, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida, AMC-473, altretamina, AP-5280, apaziquona, brostalicina, Bendamustina, carmustina, estramustina, fotemustina, glufosfamida, ifosfamida, KW-2170, mafosfamida e mitolactol; compostos alquilantes coordenados com platina incluem, mas não são limitados a, cisplatina, Paraplatin (carboplatina), eptaplatina, lobaplatina, nedaplatina, Eloxatin (oxaliplatina, Sanofi) ou satrplatina e combinações dos mesmos. Os agentes alquilantes particularmente preferidos incluem Eloxatin (oxaliplatina).

Os antimetabólitos incluem, mas não são limitados a, metotrexato, ribósido de 6-mercaptopurina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo (5-FU) isoladamente ou em combinação com leucovorina, tegafur, UFT, doxifluridina, carmofur, citarabina, ocfosfato de citarabina, enocitabina, S-1, Alimta (premetrexed dissódio, LY231514, MTA), Gemzar (gencitabina, Eli Lilly), fludarabina, 5-azacitidina, capecitabina, cladribina, clofarabina, decitabina,

eflornitina, etinilcitidina, citosina arabinósido, hidroxiuréia, ST-1, melfalano, nelarabina, nolatrexed, ocfosfato, premetrexed dissódio, pentostatina, pelitrexol, raltitrexed, triapina, trimetrexato, vidarabina, vincristina, vinorelbina; ou, por exemplo, uma dos antimetabolitos preferidos divulgados no Pedido de Patente Europeu N° 239362 tal como ácido N-(5-[N-(3,4-diidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil)-L-glutâmico e suas combinações.

Antibióticos incluem antibióticos de intercalação, mas não estão limitados a eles: aclarrubicina, actinomicina D, anrubicina, anamicina, adriamicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, elsamitrucina, epirrubicina, galarrubicina, idarrubicina, mitomicina C, nemorrubicina, neocarziristatina, peplomicina, pirarrubicina, rebecamicina, stimalamer, estreptozocina, valrubicina, zinostatina e combinações dos mesmos.

Substâncias antitumorais derivadas de planta, por exemplo, aquelas selecionadas de inibidores da mitose, por exemplo, vinblastina, docetaxel (Taxotere), paclitaxel e suas combinações.

Agentes inibidores da topoisomerase citotóxica incluem um ou mais agentes selecionados do grupo consistindo em aclarubion, amonafide, belotecan, camptotecina, 10-hidroxycamptotecina, 9-aminocamptotecina, diflomotecan, irinotecan HCl (Camptosar), edotecarin, epirrubicina (Ellence), etopósido, exatecan, gimatecan, lurtotecan, mitoxantrona, pirarrubicina, pixantrona, rubitecan, sobuzoxano, SN-38, taflupósido, topotecan, e combinações dos mesmos.

Os agentes inibidores da topoisomerase citotóxica preferidos incluem um ou mais agentes selecionados do grupo consistindo em camptotecina, 10-hidroxycamptotecina, 9-aminocamptotecina, irinotecan HCl (Camptosar), edotecarin, epirrubicina (Ellence), etopósido, SN-38, topotecan, e

combinações dos mesmos.

Os agentes imunológicos incluem interferões e numerosos outros agentes de reforço imunológicos. Os Interferões incluem interferão alfa, interferão alfa-2a, interferão, alfa-2b, interferão beta, o interferão gama-1a, o interferão gama-1b (Actimmune), ou interferão gama-n1 e combinações dos mesmos. Outros agentes incluem filgrastim, lentinan, sizofilan, TheraCys, ubenimex, WF-10, aldesleucina, alemtuzumab, BAM-002, dacarbazine, daclizumab, denileucina, gemtuzumab ozogamicina, ibritumomab, imiquimod, lenograstim, lentinan, vacina de melanoma (Corixa), molgramostim, OncoVAX-CL, sargramostim, tasonermin, tecleucina, timalasin, tositumomab, Virulizin, Z-100, epratuzumab, mitumomab, oregovomab, pentumomab (Y-muHMF1), Provenge (Dendreon) e combinações dos mesmos.

Os modificadores da resposta biológica são agentes que modificam os mecanismos de defesa dos organismos vivos ou respostas biológicas, tais como a sobrevivência, crescimento e diferenciação das células dos tecidos "para direccioná-los para terem atividade antitumoral. Tais agentes incluem crestin, lentinan, sizofiran, picibanil, ubenimex e combinações dos mesmos.

Outros agentes anticancerígenos incluem alitretinoína, ampligen, atrasentan bexaroteno, bortezomib, Bosentano, calcitriol, exisulind, finasterida, fotemustina, ácido ibandronico, miltefosina, mitoxantrona, I-asparaginase, procarbazona, dacarbazona, hidroxycarbamida, pegaspargase, pentostatin, tazarotene, Telcyta (TLK-286, Telik Inc.), Velcade (bortezomib, Millennium), tretinoína, e combinações dos mesmos.

Outros compostos antiangiogénicos incluem acitretin, fenretinide, talidomida, ácido zoledrónico, angiostatina, aplidine, cilengtide, combretastatina A-4, endostatina, halofuginona, rebimastat, removab, Revlimid, esqualamina, ukrain, Vitaxin e combinações dos mesmos.

Os compostos coordenados com platina incluem, mas não são limitados a eles, cisplatina, carboplatina, nedaplatina, oxaliplatina, e combinações dos mesmos.

Derivados de camptotecina incluem, mas não são limitados a eles, camptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-aminocamptotecina, irínotecan, SN-38, edotecarin, topotecano e combinações dos mesmos.

Outros agentes antitumorais incluem mitoxantrona, 1-asparaginase, procarbazina, dacarbazina, hidroxycarbamida, pentostatina, tretinoína e suas combinações.

Os agentes antitumorais capazes de aumentar as respostas imunes antitumorais, tais como anticorpos CTLA-4 (antigénio linfocitário cito-tóxico 4), e outros agentes capazes de bloquear CTLA-4 também podem ser utilizados, tais como a MDX-010 (Medarex) e compostos CTLA 4 divulgados na Patente dos Estados Unidos N° 6.682.736; e agentes antiproliferativos tais como outros inibidores farnesil proteína transferase, por exemplo, os inibidores da farnesil proteína transferase. Para anticorpos CTLA-4 específicos adicionais que podem ser usados na presente divulgação veja-se Pedido Provisório dos Estados Unidos 60/113.647 (depositado em 23 de Dezembro de 1998), Patente dos Estados Unidos N° 6.682.736. Por exemplo, um outro anticorpo anti-CTLA-4 que pode ser utilizado em conformidade com a presente divulgação é ticilimumab, que tem a sequência de anticorpo monoclonal 11.2.1 na Patente US N° 6.682.736.

Para os anticorpos IGF1R específicos que podem ser usados na presente divulgação, veja-se Pedido de Patente Internacional N° WO 2002/053596.

Para os anticorpos CD40 específicos que podem ser usados na presente divulgação, veja-se Pedido de Patente Internacional N° WO 2003/040170.

Os agentes de terapêutica genética também podem ser utilizados como agentes antitumorais tais como TNFerade

(GeneVec), que expressam TNF α em resposta à radioterapia.

Numa instância da presente divulgação, as estatinas podem ser usadas em conjunto com um anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio, conforme descrito no presente documento, e composições farmacêuticas. As estatinas (inibidores da HMG-CoA reductase) podem ser selecionadas do grupo consistindo em Atorvastatina (Lipitor, Pfizer Inc.), Pravastatina (Pravachol, Bristol-Myers Squibb), Lovastatina (Mevacor, Merck Inc.), Sinvastatina (Zo-cor, Merck Inc.), Fluvastatina (Lescol, Novartis), Cerivastatina (Baycol, Bayer), Rosuvastatina (Crestor, AstraZeneca), Lovostatina e Niacina (Advicor, Kos Pharmaceuticals), derivados e combinações dos mesmos.

Numa instância preferida a estatina é selecionada a partir do grupo consistindo em Atovorstatina e Lovastatina, derivados e combinações dos mesmos.

Outros agentes úteis como agentes antitumorais incluem Caduet.

Para qualquer um dos métodos de tratamento de um distúrbio hiperproliferativo ou crescimento celular anormal conforme descrito no presente documento usando uma combinação de um anticorpo anti-ALK-1 ou porção de ligação a antigénio com pelo menos um agente terapêutico adicional, o anticorpo anti-ALK-1 pode ser conjugado, ou derivatizado, com o agente terapêutico adicional. O pelo menos um agente terapêutico adicional também pode ser administrado separadamente, ou numa maneira não derivatizada ou não conjugada. Quando o pelo menos um agente terapêutico adicional não for derivatizado ou conjugado ao anticorpo, pode ser administrado dentro da mesma formulação farmacêutica como o anticorpo, ou pode ser administrado numa formulação separada.

Tratamento da Perda de Visão

Os compostos da divulgação e composições farmacêuticas

que os contém, são úteis para o tratamento da perda de visão grave da degeneração macular relacionada à idade e outras doenças que afetam o segmento posterior do olho, tais como a neovascularização coroidal, retinopatia diabética, glaucoma, retinite pigmentosa, e similares.

Por exemplo, as composições da divulgação podem ser utilizadas para formar um depósito de medicamento por trás do olho e podem incluir uma ou mais agentes farmacologicamente ativos, além de um ou mais excipientes não ativos conforme descrito no presente documento. Exemplos de agentes farmacologicamente ativos úteis nas composições da divulgação incluem anti-infecciosos, incluindo, sem limitação, os antibióticos, antivirais e antifúngicos; agentes anti alérgicos e estabilizantes de mastócitos; agentes anti-inflamatórios esteroides e não esteroides (como nepafenac); inibidores da ciclooxigenase, incluindo, sem limitação, inibidores da Cox I e Cox II; combinações de agentes anti-infecciosos e anti-inflamatórios; descongestionantes; agentes anti glaucoma, incluindo, sem limitação, adrenérgicos, agentes bloqueadores de beta-adrenérgico, agonistas de alfa-adrenérgico, agentes parassipatomiméticos, inibidores da colinesterase, inibidores da anidrase carbônica e prostaglandinas; combinações de agentes anti glaucoma; antioxidantes, suplementos nutricionais; medicamentos para o tratamento de edema macular cistoide incluindo, sem limitação, agentes anti-inflamatórios não esteroides; medicamentos para o tratamento de degeneração macular relacionada com a idade (AMC) incluindo AMC não exsudativa (seca) e exsudativa (húmida), incluindo, sem limitação, inibidores da angiogênese, incluindo inibidores da angiogênese que inibem os recetores da proteína cinase, incluindo recetores da proteína cinase que são recetores do VEGF; e suplementos nutricionais; medicamentos para o tratamento de infecções herpéticas e infecções oculares CMV;

medicamento para o tratamento da vitreorretinopatia proliferativa incluindo, sem limitação, antimetabólitos e fibrinolíticos; agentes de modulação da ferida, incluindo, sem limitação, os fatores de crescimento; anti-metabólitos; medicamentos neuroprotetores, incluindo, sem limitação, eliprodil; e esteroides angiostáticos para o tratamento de doenças ou condições de segmento posterior 26, incluindo, sem limitação, a degeneração macular relacionada com a idade (AMC), incluindo AMC não exsudativa (seca) e exsudativa (húmida), neovascularização coroidal, retinopatias, retinite, uveíte, edema macular e glaucoma. Para informação adicional a cerca de tais esteroides angiostáticos veja-se Patentes US N° 5.679.666 e 5.770.592. Um anti-inflamatório não esteroide para o tratamento de edema macular cistoide é nepafenac.

Para administração nos olhos, um composto da presente divulgação é liberado num veículo oftalmológico farmacêuticamente aceitável tal que o composto é mantido em contacto com a superfície ocular por um período de tempo suficiente para deixar o composto penetrar na córnea e/ou esclerótica e regiões internas do olho, incluindo, por exemplo, a câmara anterior, câmara posterior, corpo vítreo, humor aquoso, humor vítreo, córnea, íris/ciliar, lente, coróide/retina e a esclerótica. O veículo oftalmológico farmacêuticamente aceitável pode ser uma pomada, óleo vegetal, ou um material encapsulado. Um composto da divulgação pode também ser injetado diretamente no humor vítreo ou humor aquoso.

Além disso, um composto pode ser também administrado por métodos aceitáveis bem conhecidos, tais como a sub-Tenon e/ou injeções subconjuntivais. Como é bem sabido na técnica oftálmica, a mácula está compreendida principalmente de cones da retina e é a região de máxima acuidade visual na retina. Uma cápsula de Tenon ou membrana de Tenon é disposta na esclerótica. Uma conjuntiva abrange

uma pequena área do globo do olho posterior até o limbo (a conjuntiva bulbar) e se dobra para cima (o fundo de saco superior) ou para baixo (o fundo de saco inferior), para cobrir as áreas internas da pálpebra superior e pálpebra inferior, respectivamente. A conjuntiva é disposta na parte de cima da cápsula de Tenon. A esclerótica e a cápsula de Tenon definem a superfície exterior do globo do olho. Para o tratamento de doenças oculares tais como a degeneração macular relacionada com a idade (AMC), incluindo AMC não exsudativa (seca) e exsudativa (húmida), neovascularização coroidal, retinopatias (tais como a retinopatia diabética, retinopatia da prematuridade), edema macular diabético, retinite, uveíte, edema macular cistoide (CME), glaucoma e outras doenças ou condições do segmento posterior dos olhos, é preferível dispor um depósito de uma quantidade específica de um agente oftalmicamente aceitável farmacologicamente ativo diretamente sobre a superfície externa da esclerótica e a seguir da cápsula de Tenon. Além disso, nos casos de degeneração macular relacionada com a idade (AMC) incluindo a AMC não exsudativa (seca) e exsudativa (húmida) AMC e CME é mais preferível dispor o depósito diretamente sobre a superfície externa da esclerótica, a seguir da cápsula de Tenon, e geralmente acima da mácula.

Os compostos podem ser formulados como uma preparação de depósito. Tais formulações de ação prolongada podem ser administradas pela implantação (por exemplo, por via subcutânea ou intramuscular), injeção intramuscular ou pela injeção sub-Tenon ou intravítrea mencionada acima. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para constituição com um „veículo adequado, por exemplo, água livre de pirogênio estéril, antes da sua utilização.

Dentro das instâncias particularmente preferidas da divulgação, os compostos podem ser preparados para a

administração tópica em solução salina (combinados com qualquer um dos conservantes e agentes anti-microbianos comumente utilizados nas preparações oculares), e administrada na forma de colírio. A solução ou suspensão pode ser preparada na sua forma pura e administrada várias vezes ao dia. Alternativamente, as presentes composições, preparadas conforme descrito acima, podem também ser administradas diretamente na córnea.

Dentro das instâncias preferidas, a composição é preparada com um polímero muco-adesivo que se liga na córnea. Assim, por exemplo, os compostos podem ser formulados com materiais poliméricos ou hidrofóbicos adequados (por exemplo, como uma emulsão num óleo aceitável) ou resinas de permuta de íon, ou como derivados moderadamente solúveis, por exemplo, como um sal moderadamente solúvel.

Um veículo farmacêutico para compostos hidrofóbicos é um sistema co-solvente que compreende álcool benzílico, um tensioativo não polar, um polímero orgânico miscível em água, e uma fase aquosa. O sistema co-solvente pode ser um sistema co-solvente VPD. VPD é uma solução de 8% p/v de álcool benzílico, 8% p/v do tensioativo não polar polisorbato 80, e 65% p/v de polietilenoglicol 300, preparado em volume de etanol absoluto. O sistema co-solvente VPD (VPD:5W) contém VPD diluído 1:1 com dextrose a 5% em solução aquosa. Este sistema de co-solvente dissolve compostos hidrofóbicos, e produz por si mesmo baixa toxicidade após administração sistêmica. Naturalmente, as proporções de um sistema co-solvente podem variar consideravelmente sem destruir suas características de solubilidade e toxicidade. Além disso, a identidade das porções co-solventes pode ser variada: por exemplo, outros tensioativos não polares de baixa toxicidade podem ser utilizados em vez de polisorbato 80, o tamanho de fração do polietileno glicol pode ser variado; outros polímeros

biocompatíveis podem substituir o polietileno glicol, por exemplo, polivinil pirrolidona; e outros açúcares ou polissacáridos podem ser substituídos por dextrose.

Alternativamente, outros sistemas de liberação para os compostos farmacêuticos hidrofóbicos podem ser utilizados. Lipossomas e emulsões são exemplos conhecidos de veículos ou veículos de liberação para medicamentos hidrofóbicos. Certos solventes orgânicos tais como dimetilsulfóxido também podem ser utilizados, embora geralmente à custa de uma maior toxicidade. Adicionalmente, os compostos podem ser liberados usando um sistema de liberação sustentada, tal como matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o agente terapêutico. Vários materiais de liberação sustentada foram estabelecidos e são conhecidos por aqueles versados na técnica. As cápsulas de liberação sustentada podem, em função da sua natureza química, liberar os compostos durante algumas semanas até mais de 100 dias. Dependendo da natureza química e da estabilidade biológica do reagente terapêutico, estratégias adicionais para a estabilização de proteína podem ser utilizadas.

As composições farmacêuticas também podem compreender veículos ou excipientes de fase sólida ou gel adequados. Exemplos de tais veículos ou excipientes incluem carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros tais como o polietileno glicol.

Qualquer uma das composições pode ser formulada para administração a um indivíduo. Um indivíduo da presente divulgação é preferivelmente um mamífero, ou mais preferivelmente um ser humano.

As formulações farmacêuticas aqui podem ainda incluir um agente terapêutico selecionado a partir do grupo consistindo em: um agente antineoplásico, um agente anti-inflamatório, um agente antibacteriano, um agente antiviral, um agente angiogénico, e um agente

antiangiogénico. Exemplos de tais agentes são revelados no presente documento.

Por exemplo, um agente antineoplásico pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em Cloridrato de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Ansacrina; Anastrozol; Antramicina; Asparaginase; Asperlin; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Cloridrato de Bisantrono; Dimesilato de Bisnafide; Bizelesin; Sulfato de Bleomicina; Brequinar de sódio; Bropirimina; busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatina; Carmustina; Cloridrato de Carubicina; Carzelesin; Cedefingol; Clorambucil; Cirolemicina; Cisplatina; cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Cloridrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatina; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; doxorubicina; Cloridrato de doxorubicina; Droloxifeno; citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Cloridrato de Eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatina; Enpromato; Epiropidina; Cloridrato de Epirubicina; Erbulozol; Cloridrato de Esorubicina; Estramustina; Estramustina Fosfato de sódio; Etanidazol; Ethiodized Oil I 131; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etopri-na; Cloridrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina de sódio; Gencitabina; Cloridrato de Gencitabina; Gold Au 198; Hidroxiuréia; Cloridrato de Idarrubicina; Ifosfamida; Imofosina; Interferão Alfa-2A; Interferão Alfa-2b; Interferão Alfa-n1; Interferão Alfa-n3; Interferão beta-1a; Interferão Gama-1b; Iproplatina; Cloridrato de Irinotecan; Acetato de Lanreotide; Letrozol; Cloridrato de Liarozol Acetato de Leuprolide; Lometrexol de sódio; Lomustina; Cloridrato de Losoxantrona; Masoprocol;

Maitansina; Cloridrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalan; Menogaril; Mercaptopurina; metotrexato; métotrexato de sódio; Metoprina; Meturedapa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Cloridrato de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatina; Oxissurano; Paclitaxel; Pegaspargase; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobroman; Pipsulfan; Cloridrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero sódico; Porfiomicina; Prednimustina; Cloridrato de Procarbazina; Puomicina; Cloridrato de Puomicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Cloridrato de Safingol; Semustina; Sintrazeno; Esparfosato de sódio; Esparsomicinl, Cloridrato de Espirogermânio; Espiromustina; Espiroplatina; Estreptonigrina; Estrepto-zocina; Cloreto de Estrôncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalan de sódio; Tegafur; Cloridrato de Teloxantrona; Temoporfin; Teniposideo; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurin; Tirapazamina; Cloridrato de Topotecano; citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Trimetrexato Glucuronato; Triptorelina; Cloridrato de Tubulozol; Mostarda de Uracilo; Uredapa; Vapreotide; Vertepprfín; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatina; Zinostatina; Cloridrato de Zorrubicina.

Agentes antiangiogénicos são quaisquer agentes que inibem a angiogénese, quer revelados aqui ou conhecidos na técnica. Nas instâncias preferidas, um agente antiangiogénico é um agente anti-VEGF, tal como Macugen™ (Eyetechn, Nova Iorque, NY), ou anticorpos anti-VEGF.

As composições farmacêuticas podem ser formuladas por técnicas padrão usando um ou mais veículos, excipientes e diluentes adequados. Veja-se, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, (19^a Ed. Williams & Wilkins, 1995).

As formulações adequadas para a administração parentérica incluem formulações isotônicas aquosas e não aquosas com o sangue do destinatário; e as suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir os sistemas de suspensão designados para direcionar o composto para as porções do sangue ou um ou mais órgãos. As formulações podem ser apresentadas em recipientes lacrados de dose unitária ou múltiplas doses, por exemplo, ampolas ou frascos. Para as formulações infraoculares, as dosagens unitárias são preferidas porque nenhum conservante está na formulação. Para outras formulações parentéricas, conservante pode ser utilizado, o que levaria em conta os recipientes de múltiplas doses.

As soluções e suspensões de injeção extemporâneas podem ser preparadas, por exemplo, a partir de pós estéreis. As formas parentéricas e intravenosas podem também incluir minerais e outros materiais para torná-las compatíveis com o tipo de injeção ou o sistema de liberação escolhido.

As administrações parentéricas particulares contempladas pela presente divulgação incluem administrações infraoculares e intravitreas ao olho. As formulações farmacêuticas para administrações infraoculares e intravitreas incluem salina tamponada de fosfato (PBS) e solução salina isotônica equilibrada (BSS) com ou sem excipientes tais como manitol ou sorbitol como estabilizadores de proteína.

Em geral, água, óleo adequado, salina, dextrose aquosa (glicose), ou soluções de açúcar relacionadas e glicóis tais como propileno glicol ou polietileno glicol são

veículos adequados para soluções parentéricas. As soluções para a administração parentérica preferivelmente contêm um sal hidrossolúvel do ingrediente ativo, agentes estabilizantes adequados e, se necessário, substâncias tamponantes. Os agentes antioxidantes, tais como bissulfito de sódio, sulfito de sódio ou ácido ascórbico, isoladamente ou combinados, são agentes estabilizantes adequados. Também são utilizados sais de ácido cítrico destes, ou EDTA de sódio. Além disso, as soluções parentéricas podem conter conservantes, tais como cloreto de benzalcônio, metil-ou propil-parabeno, ou clorobutanol. Os veículos farmacêuticos adequados são descritos em Remington, citados *supra*.

Em qualquer uma das instâncias aqui, uma composição ou formulação farmacêutica neste documento pode ser liofilizada.

Em qualquer das instâncias, as formulações farmacêuticas preferíveis possuem menos do que cerca de 10, mais preferivelmente menos do que cerca de 5, mais preferivelmente menos do que cerca de 3, ou mais preferivelmente menos do que cerca de 1 unidade de endotoxina por miligrama de agentes terapêuticos.

Em algumas instâncias, os métodos de tratamento revelados no presente documento ainda incluem a administração a um indivíduo que sofre de uma condição angiogénica de um ou mais agentes terapêuticos selecionados do grupo consistindo em agentes antineoplásicos, agentes antivirais, agentes anti-inflamatórios, agentes antibacterianos, agentes antiangiogénicos ou agentes antiangiogénicos.

Tais tratamentos de combinação podem ser obtidos mediante a administração num indivíduo de uma co-formulação das composições aqui contidas com o(s) agente(s) terapêutico(s) adicional(is) ou mediante a administração das composições aqui contidas e o(s) agente(s) terapêutico(s) como duas formulações farmacêuticas

separadas. Nas instâncias em que mais do que uma composição/agente terapêutico é administrada a um indivíduo, dosagens mais baixas das composições e/ou agente(s) terapêutico(s) podem ser utilizadas como um resultado do efeito sinérgico de ambos os ingredientes ativos.

Os agentes antineoplásicos que podem ser administrados a um indivíduo incluem, mas não são limitados a, Aclarrubicina; Cloridrato de Acodazol; Acronina; Adozelesina; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Ansacrina; Anastrozol; Antramicina; Asparaginase; Asperlin; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Cloridrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafide; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar de sódio; Bropirimina; busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatina; Carmustina; Cloridrato de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatina; cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; Cloridrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatina; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; doxorubicina; Cloridrato de doxorubicina; Droloxifeno; citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Cloridreto de Eflornitina; Elsamitrucina; Enloplatina; Enpromato; Epiropidina; Cloridrato de Epirubicina; Erbulozol; Cloridrato de Esorubicina; Estramustina; Estramustina Fosfato de sódio; Etanidazol; Ethiodized Oil I 131; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Cloridrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxurridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina de sódio; Gencitabina; Cloridrato de Gencitabina; Gold Au 198; Hidroxiuréia; Cloridrato de Idarrubicina; Ifosfamida;

Imofosina; Interferão Alfa-2A; Interferão Alfa-2b; Interferão Alfa-n1; Interferão Alfa-n3; Interferão beta-1a; Interferão Gama-1b; Iproplatina; Cloridrato de Irinotecan; Acetato de Lanreótido; Letrozol; Cloridrato de Liarozol; Acetato de Leuprolide; Lometrexol de sódio; Lomustina; Cloridrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maitansina; Cloridrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalano; Menogaril; Mercaptopurina; metotrexato; Metotrexato de sódio; Metoprina; Meturedapa; Mitindomida; Mitocarcin; Mitocromina; Mitogilin; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Cloridrato de Mitoxantrona; Ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamicina; Ormaplatina; Oxisuran; Paclitaxel; Pegaspargase; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobroman; Puposulfan; Cloridrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero sódico; Porfiromicina; Prednimustina; Cloridrato de Procarbazona; Puromicina; Cloridrato de Puromicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Cloridrato de Safingol; Semustina; Sintrazeno; Esparfosato de sódio; Esparsomicinl, Cloridrato de espirogermânio; Espiromustina; Espiroplatina; Estreptonigrina; Estreptozocina; Cloreto de Estrôncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoide; Tecogalan de sódio; Tegafur; Cloridrato de Teloxantrona; Temoporfin; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurin; Tirapazamina; Cloridrato de Topotecano; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Trimetrexato Glucuronato; Triptorelina; Cloridrato de Tubulozol; Mostarda de Uracilo; Uredapa; Vapreótido; Verteporfina; Sulfato de d Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzoíidina; Vorozol; Zeniplatina;

Zinostatina; Cloridrato de Zorrubicina.

Os agentes antibacterianos que podem ser administrados a um indivíduo incluem, mas não estão limitados a eles, penicilinas, aminoglicósidos, macrólidos, monobactâmicos, rifamicinas, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, imipenem, ácido fusídico, novobiocina, fosfomicina, fusidato sódio, neomicina, polimixina, Capreomicina, colistimetato, colistina, gramicidina, minociclina, doxiciclina, vancomicina, bacitracina, canamicina, gentamicina, eritromicina e cefalosporinas.

Os agentes anti-inflamatórios que podem ser administrados a um indivíduo incluem, mas não são limitados a, AINE (por exemplo, aspirina (salicilamida), salicilamida de sódio, indoprofen, indometacina, indometacina de sódio trihidratado, Bayer™, Bufferin™, Celebrex™, diclofenac, Ecotrin™, diflunisal, fenoprofen, naproxeno, sulindac, Vioxx™), corticosteroides ou corticotropina (ACTH), colquicina e acetato de anecortave.

Os agentes antivirais que podem ser administrados a um indivíduo incluem, mas não são limitados a eles, α -metil-P-adamantano metilamina, 1,-D-ribofuranosil-1,2,4-triazóis-3 carboxamida, 9-[2-hidroxi-etoxi]metilguanina, adamantanamina, 5-iodo-2'-deoxiuridina, trifluorotimidina, interferão, arabinósido de adenina, CD4, 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), 9-(2-hidroxietoximetil)-guanina (aciclovir), ácido fosfonofórmico, 1-adamantanamina, péptido T, e 2',3'dideoxycitidina.

A administração de uma composição da presente divulgação a uma célula alvo *in vivo* pode ser realizada utilizando qualquer uma de uma variedade de técnicas bem conhecidas dos peritos na especialidade.

Por exemplo, as composições da presente divulgação podem ser administradas sistêmica ou localmente por qualquer meio conhecido na técnica (por exemplo, por via oral, intraocular, intravascular (i.v.), intradérmica,

intramuscular, transdérmica, transmucosa, entérica, parentérico, por inalação pulverização, rectal, ou topicamente), em formulações de dosagem unitária e contendo veículos, adjuvantes e veículos farmacêuticamente aceitáveis convencionais.

Como é utilizado no presente documento o termo intraocularmente inclui intra-vítrea, sub-retiniana, e similares.

Como é utilizado no presente documento o termo parentérica como usado inclui, subcutânea, endovenosa, intramuscular, intraesternal, técnicas de infusão ou intraperitoneal. Supositórios para administração rectal do medicamento podem ser preparados mediante a mistura do medicamento com um excipiente não irritante adequado tal como manteiga de cacau e polietileno glicóis que são sólidos em temperaturas normais, mas líquidos na temperatura rectal e, por isso, derreterá no reto e liberará o medicamento.

O regime de dosagem para o tratamento de um distúrbio ou uma doença com as composições desta divulgação se baseia numa variedade de fatores, incluindo o tipo de doença, a idade, peso, sexo e estado clínico do paciente, a gravidade da patologia, a via de administração, e o composto particular utilizado. Assim, o regime posológico pode variar amplamente, mas pode ser determinado rotineiramente utilizando métodos padrão.

Para a administração sistémica, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio da presente divulgação e/ou um ou mais agentes terapêuticos adicionais são preferivelmente administrados numa dose de pelo menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 ou 150 mg/kg de peso corporal. Em outras instâncias, os polipéptidos (de preferência dímeros ou homodímeros) e/ou de moléculas pequenas são aqui

sistemicamente administrados numa dose de 0,1 a 100 mg/kg, mais preferivelmente de 0,5 a 50 mg/kg, mais preferivelmente de 1 a 30 mg/kg de peso corporal, ou mais preferivelmente de 5 a 20 mg/kg.

Para a administração localizada, o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio da presente divulgação e/ou um ou mais agentes terapêuticos adicionais são preferivelmente administrados numa dose de pelo menos 50 µg, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 350 µg, 400 µg, 450 µg, 500 µg, 550 µg, 600 µg, 650 µg ou 700 µg. Em outras instâncias, os polipéptidos (preferivelmente dímeros ou homodímeros) e/ou moléculas pequenas aqui são administrados localmente numa dose de 50 a 1000 µg, mais preferivelmente de 100 a 800 µg, mais preferivelmente de 200 a 500 µg, ou mais preferivelmente de 300 a 400 µg por local.

Por exemplo, para a administração dérmica o anticorpo anti-ALK-1 ou porção do mesmo de ligação a antigénio da presente divulgação e/ou peptidomiméticos e/ou um ou mais agentes terapêuticos são administrados numa dose de 50 a 1000 µg/cm², mais preferivelmente de 100 a 800 µg/cm², ou mais preferivelmente de 200 a 500 µg/cm². Em outro exemplo, para administração ocular, os polipéptidos e/ou peptidomiméticos e/ou moléculas pequenas da presente divulgação são administrados numa dose de 50 a 1000 µg/olho, mais preferivelmente de 100 a 800 µg/olho, ou mais preferivelmente de 200 a 500 µg/olho.

As composições farmacêuticas preferivelmente incluem o ingrediente ativo (por exemplo, um anticorpo anti-ALK-1), numa quantidade eficaz, isto é, numa quantidade eficaz para alcançar o benefício terapêutico ou profilático. A quantidade real eficaz para uma aplicação particular vai depender da condição a ser tratada e da via de administração. A determinação de uma quantidade eficaz está bem dentro da capacidade dos peritos na especialidade,

especialmente à luz da divulgação aqui apresentada.

Preferivelmente, a quantidade eficaz do ingrediente ativo, por exemplo, um anticorpo anti-ALK-1, é de cerca de 0,0001 mg a cerca de 500 mg de agente ativo por quilograma de peso corporal de um paciente, mais preferivelmente de cerca de 0,001 a cerca de 250 mg de agente ativo por quilograma de peso corporal do paciente, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,01 mg a cerca de 100 mg de agente ativo por quilograma de peso corporal do paciente, ainda mais preferivelmente de cerca de 0,5 mg a cerca de 50 mg de agente ativo por quilograma de peso corporal do paciente, e o mais preferível de cerca de 1 mg a cerca de 15 mg de agente ativo por quilograma de peso corporal do paciente.

Em termos de percentagem em peso, as formulações da presente divulgação preferivelmente compreenderão o agente ativo, por exemplo, um anticorpo anti-ALK-1, numa quantidade de cerca de 0,0001 a cerca de 10% em peso, mais preferivelmente de cerca de 0,001 a cerca de 1% em peso, mais preferivelmente de cerca de 0,05 a cerca de 1% em peso, ou mais preferivelmente cerca de 0,1 a cerca de 0,5% em peso.

Terapêutica Genética

As moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos e porções de anticorpos da presente divulgação podem ser administradas a um paciente com necessidade através da terapêutica genética. A terapêutica pode ser *in vivo* ou *ex vivo*. Numa instância preferida, as moléculas de ácido nucleico que codificam tanto uma cadeia pesada quanto uma cadeia leve são administradas a um paciente. Numa instância mais preferida, as moléculas de ácido nucleico são administradas tais que elas são estavelmente integradas em cromossomas de células B, porque estas células são especializadas para a produção de anticorpos. Numa instância preferida, as células precursoras B são

transfectadas ou infetadas *ex vivo* e re-transplantadas num paciente em necessidade do mesmo. Numa outra instância, as células precursoras B ou outras células são infetadas *in vivo* usando um vírus conhecido de infetar o tipo de célula de interesse. Os vetores típicos utilizados para a terapêutica genética incluem lipossomas, plasmídeos e vetores virais. Os vetores virais exemplares são retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Após a infeção, quer *in vivo* ou *ex vivo*, os níveis de expressão de anticorpos podem ser monitorizados por tomar uma amostra do paciente tratado e usar qualquer imunoensaio conhecido na técnica ou debatido no presente documento.

Numa instância preferida, o método de terapêutica genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antigénio desta de um anticorpo anti-ALK-1 e que expressa a molécula do ácido nucleico. Em outra instância, o método de terapêutica genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia leve ou uma porção de ligação a antigénio desta de um anticorpo anti-ALK-1 e que expressa a molécula de ácido nucleico. Num método mais preferido, o método de terapêutica genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antigénio desta e uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia leve ou a porção de ligação a antigénio desta de um anticorpo anti-ALK-1 da divulgação e que expressa as moléculas de ácido nucleico. O método de terapêutica genética pode também compreender a etapa de administrar um outro agente terapêutico, tal como qualquer um dos agentes debatidos anteriormente em conexão com a terapêutica de combinação.

Método para o rastreio de Antagonistas ou Agonistas de ALK-

Numa instância, a presente divulgação proporciona um método para determinar se uma substância inibe a regulação positiva de um gene alvo jusante específico da ALK-1, Id1, tal como, por exemplo, o Ensaio Taqman para Id1 descrito no Exemplo 12. O método compreende colocar em contacto uma amostra de células que expressam Id1 com a substância e determinar se a expressão de Id1 foi inibida, em que um nível reduzido de expressão de Id1 na amostra das células colocadas em contacto com a substância quando comparado com uma amostra de controlo de células é indicativo de dita substância que inibe a expressão de Id1. Numa instância específica, a substância é um anticorpo que se liga ao domínio extracelular da ALK-1. Em outra instância, a substância é uma molécula pequena. De acordo com a divulgação, as células podem expressar inerentemente tanto ALK-1 quanto Id1, tais como HUVECs descritas no Exemplo 12, ou que foram transformados ou transfectadas com ADN que codifica uma ou ambas destas. Pode-se determinar a expressão de Id1 através da, por exemplo, utilização de Ensaio Taqman para Id1 descrito no Exemplo 12.

Inversamente, os ativadores ou agonistas também podem ser testados, ou utilizados, seguindo os mesmos tipos de procedimentos.

De modo que esta divulgação possa ser mais bem compreendida, os seguintes exemplos são apresentados. Estes exemplos são para propósitos de ilustração e não devem ser interpretados como limitativos do âmbito da divulgação de qualquer maneira.

Exemplos

Nos seguintes exemplos e preparações, "MW" significa peso molecular; "Cauda de His" significa a cauda de polihistidina C-terminal (6xHis) para a rápida purificação com a resina quelante do níquel e deteção com um anticorpo anti-His (C-terminal); "BSA" significa albumina de soro bovino; "EDTA" significa ácido etilenodiaminatetraacético;

"DMSO" significa sulfóxido de dimetilo; "MOPS" significa o ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico; "MES" significa o ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico; "PBS" significa solução salina tamponada com fosfato; "dPBS" significa solução salina tamponada de fosfato de Dulbecco; "HEMA" significa metacrilato de 2-hidroxietilo; "DMEM" significa meio de Eagle modificado de Dulbecco; "FBS" significa soro bovino fetal; "NEAA" significa aminoácidos não essenciais; "HEPES" significa ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico; e "DMF" significa dimetilformamida.

Exemplo 1, Preparação do Imunogénio ALK-1

O DEC do ALK foi clonado do clone ORF de ALK-1 humano de comprimento completo (Invitrogen, Clone ID IOH21048) por PCR com a utilização dos iniciadores direto 5'-ACGGCCCAGCCGGCCGACCCTGTGAAGCCGTCT (SEQ ID NO: 96) e 5'-ACTA4GCTTTTAATGATGATGATGATGATGCTGGCCATCTGTTCCCG (SEQ ID NO: 97) reverso. O produto da PCR foi purificado, tratado com as enzimas de restrição SfiI e HindIII, e clonado no local SfiI/HindIII de um vetor de expressão de mamíferos pSecTag2/Hygro (Invitrogen Inc., N° de Catálogo V910-20). O clone foi usado para transientemente transfectar as células 293T com o reagente de transfeção Eugene 6 (Roche Applied Science, N° de Catálogo 1814443), seguindo-se as instruções do fabricante. O sobrenadante da cultura celular contendo a proteína alvo segregada foi colhido 72 horas após a transfeção e deixado ligar-se à resina Ni-NTA (QIAGEN, N° de Catálogo 30430) em 4 °C durante a noite. A resina foi então lavada com tampão contendo Tris 20 mM, pH 8,0, imidazol 25 mM e cloreto de sódio 300 mM. A proteína Cauda de His foi removida por eluição da resina com a utilização do tampão contendo Tris 20 mM, pH 8,0, imidazol 300 mM e cloreto de sódio 300 mM. Uma resina de permuta de catiões CM Sepharose foi usada para ainda purificar a proteína em fosfato de sódio 20 mM (pH 7,0), e a fração não ligada contendo a proteína alvo foi colhida. A proteína foi

permutada no tampão por PBS ou HEPES 10 mM, pH 7,4, mais cloreto de sódio por diálise, e concentrada a 0,2 a 1 mg/ml com uma pureza final de > 90%, avaliada por gel de SDS PAGE corado com azul de Coomassie. A proteína DEC ALK-1 com cauda de His foi intensamente glicosilada com um MW aparente de 26 KDa, em comparação com um MW teórico de 11 KDa para a proteína. A proteína com cauda de His DEC ALK-1 (SEQ ID NO: 98) foi usada para a geração do anticorpo anti-ALK-1 produtor dos hibridomas, conforme descrito no Exemplo 2.

Proteína DEC ALK-1 com cauda de His humana:

sequência de genes: a parte de letras minúsculas é o sinal de secreção):

atggagacagacacaciccgcctatgggtactgctgctctgggtccaggtccactggtagcgcggccagccggccGACCTGTGAAGC
CGTCTCGGGGCCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGG
GGGGCCTGGTGCACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCT
GCGGGAACCTTGACAGGGAGCTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGC
GACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCCTTCGGAGCAG
CCGGGAACAGATGGCCAGCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO: 99)

sequência de proteínas:

DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHY
CCDSHLCHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQHSHHHHH (SEQ ID NO: 98)

Exemplo 2. Geração de Anticorpo anti-ALK-1 Produtor de Hibridomas

Ratinhos XENOMOUSE® de oito a dez semanas de idade foram imunizados em suas patas traseiras com 10 µg/ratinho ou de quimera ALK-1/Fc recombinante humano (R&D Systems, Inc., Número de Catálogo 370-AL) ou com a proteína de cauda de His DEC ALK-1 descrita no Exemplo 1. Esta dose foi repetida cinco a sete vezes durante um período de três a cinco semanas. Três ou quatro dias antes da fusão, os ratinhos receberam uma injeção final do imunogénio em PBS. Os linfócitos dos nódulos linfáticos dos ratinhos imunizados foram fundidos com a linha de células P3-X63 Ag8.653 através da electrofusão das células [Nº de Cat. de ATCC CRL 1580), e estas células fundidas foram submetidas à

seleção de HA-DMEM como anteriormente descrito (DMEM/15% de FBS/1% de L-glutamina 200 mM /1% aminoácido não essencial 100X/1% Pen 100X/Strep/10 U/ml de IL-6/1 frasco/litro de suplemento de meio OPI mais 0,5x HA (Azasserina-Hipoxantina, Sigma, N° de Cat. A9666)]. Um painel de hibridomas foi recuperado, todos os quais segregam os anticorpos de IgG2 humano específico de ALK-1.

O ensaio ELISA foi usado para detetar a ligação do anticorpo. O imunogénio foi aplicado à placa de microtitulação Immulon de 96 poços (superfície MaxiSorp™ da placa NUNC-Immuno™, Nalge Nunc International, N° de Cat. 439454) a 4 µg/ml em tampão de bicarbonato de sódio 50 mM durante a noite, a 4 °C. As placas foram lavadas e depois bloqueadas com PBS com a adição de 0,1% de Tween-20 e 0,5% de albumina de soro bovino. Os anticorpos foram acrescentados às placas de ELISA bloqueadas, incubados por 1 hora, e lavados com PBS com Tween-20. A ligação foi detetada por IgG humana-peroxidase de rábano-silvestre (Pierce, N° de Catálogo 31420) seguido pela adição de ABTS (Pierce, N° de Catálogo 37615). As medições colorimétricas foram realizadas em 405 nm numa leitora de micro-placas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices).

Vinte e cinco hibridomas foram selecionados para estudo adicional. Estes eram células isoladas clonadas por diluição limitativa e foram designados 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(rWT); 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1.

A linha LN 15916 de Células de Hibridoma de Ratinho (o hibridoma 1.12.1) foi depositada sob termos de acordo com o Tratado de Budapeste na Coleção Americana de Culturas Celulares (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 em 21 de Junho de 2005. Ao hibridoma 1.12.1 foi

atribuído o seguinte número de acesso: PTA-6808.

Exemplo 3. Sequências de Anticorpos Anti-ALK-1

Para analisar a estrutura de anticorpos produzida de acordo com a divulgação, foram clonados ácidos nucleicos que codificam os fragmentos de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais anti-ALK-1 produtores dos hibridomas. A clonagem e a sequenciação foram realizadas por meios padrão.

O ARNm poli(A)⁺ foi isolado com a utilização de um kit Fast-Track™ (Invitrogen) de aproximadamente 2×10^5 células de hibridoma para cada um dos anticorpos de ALK-1. O ADNc foi sintetizado do ARNm mediante a utilização de iniciadores aleatórios. O ADNc iniciado aleatoriamente foi amplificado por PCR com a utilização de iniciadores de domínio variável específicos da família de V_H humano ou de V_K humano, em combinação com iniciadores específicos para a região constante Cγ2 humana, ou uma região constante Cκ para amplificar a região variável de anticorpos incluindo todas as regiões da estrutura (FRs) e regiões determinadoras da complementaridade (CDRs). Foram obtidas as sequências de ácido nucleico que codificam os transcritos humanos de cadeia pesada e de cadeia leve capa dos hibridomas produtores de anti-ALK-1 por sequenciação direta de ambas as cadeias dos produtos da PCR. As sequências foram analisadas com a utilização do programa registrado da Abgenix e a informação publicamente disponível quanto aos genes humanos V_H e V_K, o "registro de sequências V BASE), Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Resultados idênticos podem ser obtidos com a utilização do programa de alinhamento de sequências publicamente disponível, por qualquer pessoa de experiência normal, com a utilização dos programas de software MacVector e Geneworks.

Especificamente, o anticorpo 1.12.1 ALK-1 de comprimento completo foi clonado nos vetores de expressão

como se segue: o ARNm poli(A)⁺ foi isolado com a utilização de um *kit* RNeasy Mini (Qiagen) e o ADNc sintetizado do ARNm com o *kit* Advantage RT-para-PCR (BD Biosciences) com a utilização de iniciação de oligo(dT). O ADNc iniciado por oligo(DT) para clonar 1.12.1 foi amplificado com a utilização dos iniciadores listados no Quadro 2. A amplificação foi obtida com a utilização da polimerase *Pfu* Ultra (Stratagene) e um PTC-200 ADN Engine (MJ Research) com ciclagem como se segue: 3'@95 °C; 25x (20" @ 95 °C, 30"@52 °C, 1'20"@72 °C); 10'@72 °C. Os clones tiveram as sequências verificadas com a utilização da Grills 16^a BDTv3.1/química dGTP (Applied Biosystems Inc.) e um Analisador de ADN 3730x1 (Applied Biosystems Inc.). No processo de clonar 1.12.1 V_H, uma mutação silenciosa foi introduzida no 8° codão, transformando "GGC" num "GGT". Todas as sequências foram analisadas por alinhamentos ao 'registo de sequências V BASE' [Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227, 776-798 (1992); Hum. Mol. Genet, 3, 853-860 (1994); EMBO J., 14, 4628-4638 (1995)].

Quadro 2

Iniciadores de Amplificação de Cadeia Pesada e Leve Usados para Clonar 1.12.1 de Comprimento Completo		
Nome do Iniciador	Sequência do Iniciador	SEQ ID NO
4-61	5'tcttcaagcttgatatctctagaagccgccaccATGAAACACCTGTGG TTCTTCCTCC 3'	105
G1/2 FL R	5'ttctctgatcagaattcctaCTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC 3'	106
A11	5'tcttcaagcttcccgggagccgccaccATGGAAACCCAGCGCAGCTT 3'	107
K_FL_R	5'ttctttgatcagaattctcaCTAACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTT G 3'	108
Bases não hibridantes em letras minúsculas		

Exemplo 4. Análise de Utilização de Genes e Análise de CDR

A partir da sequência de ácido nucleico e da sequência de aminoácidos prevista dos anticorpos, a utilização dos genes foi identificada para cada cadeia de anticorpos. O Quadro 3 apresenta a utilização de genes de clones de hibridomas selecionados dos anticorpos de acordo com a divulgação.

Quadro 3

Utilização de Genes de Cadeia Pesada e Leve							
Clone	Linha Germinal de Cadeia Pesada				Linha Germinal de Cadeia Leve		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	SEQ ID NO:	V _K	J _K
1.11.1	9	3-33	6-19	JH3B	11	L1	JK4
1.12.1	103	4-31	6-19	JH4B	126	A27	JK5
1.13.1	13	4-61	6-19	JH4B	15	A27	JK5
1.14.1	17	4-61	6-19	JH4B	19	A27	JK5
1.151.1	21	4-31	3-3	JH3B	23	B3	JK1
1.162.1	25	4-31		JH3B	27	A27	JK5
1.183.1	29	4-59	6-19	JH4B	31	L2	JK3
1.31.1		4-31	6-19	JH4B		A27	JK5
1.8.1	33	4-31	3-3	JH3B	35	B3	JK1
1.9.1	37	3-11	3-22	JH6B	39	A2	JK1
4.10.1	41	3-15	3-22	JH4B	43	A3	JK4
4.24.1	45	4-31	5-12	JH6B	47	A27	JK5
4.38.1	49	4-31	4-23	JH4B	51	B3	JK1
4.58.1	53	4-31	4-23	JH4B	55	A27	JK5
4.62.1	57	4-31	5-12	JH6B	59	A27	JK5
4.68.1	61	4-31	2-2	JH5B	63	A27	JK5
4.72.1	65	4-31	5-12	JH6B	67	A27	JK5
5.13.1	69	4-31		JH3B	71	A27	JK4
5,34.1	73	4-31		JH6B	75	A1	JK1
5.53.1	77	3-15	1-1	JH4B	79	B2	JK4
5.56.1	81	3-11	6-19	JH6B	83	A2	JK1
5.57.1	85	3-11	3-10	JH6B	87	A2	JK1

5.59.1	89	3-11	6-6	JH6B	91	A2	JK1
--------	----	------	-----	------	----	----	-----

A mutagénese, nas regiões V_H (M29I) e V_K (D19A) do clone 1.12.1, foi conduzida com os iniciadores listados no Quadro 4 e o *kit* QuickChange (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. As variantes mutadas foram verificadas por sequência e clonadas nos vetores de expressão por procedimentos padrão.

Quadro 4

Oligonucleótidos Muta gênicos (sequências 5' a 3')		
Iniciador	Sense	Antisense
1.12.1 (D19A)	CTCCAGGGGAAAGAG CC ACCCCTCTCCTGTAGG (SEQ ID NO: 109)	CCTACAGGAGAGGGT GG CTCTTTCCCTGGAG (SEQ ID NO: 110)
1.12.1 (M29T)	GGTGGCTCCAT C AGCAGTGGTGAATACTAC (SEQ ID NO: 111)	GTAGTATTCAACCACTGCT G ATGGAGCCACC (SEQ ID NO: 112)

As mutações acham-se indicadas em negrito e sublinhadas.

As moléculas de ácido nucleico codificando o domínio variável de cadeia pesada (SEQ ID NO: 5) e o domínio variável de cadeia leve (SEQ ID NO: 7) do anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A) foram depositadas sob termos de acordo com o Tratado de Budapeste, na Coleção Americana de Culturas Celulares (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 em 14 de Julho de 2005. Aos depósitos foram atribuídos os seguintes números de acesso: N° de ATCC PTA-6864 para DH5a de *E. coli* contendo o plasmídeo pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_H (M29I): UC 25502; e N° de ATCC PTA-6865 para o DH5a de *E. coli* contendo o plasmídeo pCR2.1 TOPO 1.12.1 V_k (D19A): UC 25503.

Vários anticorpos humanos específicos anti-ALK-1 apresentaram um padrão comum em CDR1 do domínio variável de cadeia pesada. Estes levam as moléculas a utilizarem os segmentos de genes V de cadeia pesada 4-31 ou 4-61. As sequências FR1 e CDR1 correspondentes a estas cadeias pesadas de anticorpos são apresentadas no Quadro 4A, alinhadas em relação às sequências da linha germinal. Um traço (-) no alinhamento indica um resíduo idêntico à linha germinal. Em todos os casos, o padrão GYYWS (SEQ ID NO: 136) no final do CDR1 sofreu mutações somáticas para produzir um novo padrão de sequências, por meio do que o resíduo G é permutado num resíduo ácido (D ou E), e o resíduo S final é permutado num N em 9 fora dos 12 exemplos. A diversidade de sequências em outras regiões do V_H indica que estas devem provavelmente ser eventos de mutação somática independentes que levam ao mesmo padrão de sequência no final do CDR1 de V_H.

Quadro 4A

Padrões de Sequências de Cadeia Pesada de Anticorpos ALK1

Clone	V-gene	D-gene	J-gene	FR1	CDR1
				QVQLQESGPGLVKPSQTL	GGSISSGGYYWS
				SLTCTVS	
	Linha			(SEQ ID NO: 122)	(SEQ ID NO:
	germinal				123)

5.34.1	VH4-31	-NA -	JH6B	-----	-----D---N
4.58.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	-----D---N
4.38.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	-----D---
5.13.1	VH4-31	-NA -	JH3B	-----	-----D---N
1.162.1	VH4-31	-NA -	JH3B	-----I---	-----E---
4.72.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----E---
4.24.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----ND---N
4.62.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----D---N
1.31.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	-----D---N
1.12.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	----M---E---
				QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	NGGSVSSGGYYWS
Linha germinal				(SEQ ID NO: 124)	(SEQ ID NO: 125)
1.13.1	VH4-61	D6-19	JH4B	--H -----	-----D---N
1.14.1	VH4-61	D6-19	JH4B	-----	-----D---N

Exemplo 5. Preparação das Moléculas Fab 1.12.1

O fragmento Fab de 1.12.1 (M29I/D19A) foi preparado pela digestão de IgG1 1.12.1 (M29I/D19A) com a utilização de papaína. O IgG1 de 1 12.1 (M29I/D19A) de comprimento completo purificado pela Proteína A foi incubado com papaína (VWR) na relação de 1:50 (papaína:proteína) em tampão contendo fosfato de sódio 30 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM e cisteína 2 mM em 37 °C por 2 a 3 horas. A mistura de digestão foi então aplicada a uma minicoluna de proteína A para remover a proteína de comprimento completo não digerida e o fragmento Fc. Fab não ligado foi colhido no fluxo passante. Uma coluna de exclusão de tamanho (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) foi então usada para ainda purificar a proteína Fab e para trocar o tampão em PBS. A endotoxina foi removida pela aplicação da solução proteica através do gel Detoxi (PIERCE) e da coluna de permuta de iões Vivapure Mini Q (VivaScience) subsequentemente. A proteína foi filtrada com o filtro de seringa de 0,2 µm e o nível de endotoxina foi testado com um *kit* de pirogénio LAL

(Cambrex). A proteína purificada final tinha uma concentração de 2 a 3 mg/ml, com o nível de endotoxina de < 0,1 EU/mg e pureza de > 95%. O fragmento Fab 1.12.1 (M29I/D19A) tinha um peso molecular de 47.347, sob condição não reduzida, como mostrado pela espectrometria de massa de pulverização de electrões. A análise de sequenciação N-terminal de Edman confirmou a sequência de términos N de cadeia leve de EIVLTQSPG (SEQ ID NO: 113) e a sequência de cadeia pesada de QVQLQESG (SEQ ID NO: 114), respectivamente.

Exemplo 6. Determinação dos Valores da Avidéz dos Anticorpos Monoclonais anti-ALK-1 Completamente Humanos por Ressonância de Plasmão Superficial (SPR) Usando BIACORE™

As medidas da avidéz dos anticorpos anti-ALK-1 purificados mediante a ressonância de plasmão superficial com a utilização do instrumento BIACORE™ 3000 foram realizadas como segue, com a utilização dos protocolos do fabricante.

Para realizar as análises cinéticas, a proteína de fusão ALK-1/Fc humana recombinante (hALK-1/Fc) e a proteína de fusão ALK-1/Fc de cinomolgos (cALK-1/Fc) foram imobilizadas em células de fluxo separadas de um chip sensorial BIAcore CM5 usando-se o acoplamento de amina de rotina. As superfícies foram preparadas com a utilização de tampão de acetato 10 mM, pH 5,0, quando o tampão de imobilização e as densidades proteicas de 300 e 150 RU foram obtidas para as proteínas de fusão hALK-1/Fc e cALK-1/Fc, respectivamente. A desactivação dos ésteres de N-hidroxissuccinimida não reagidos foi realizada com a utilização de cloridrato de etanolamina não reagido, pH 8,5. As amostras de anticorpos no tampão em desenvolvimento foram preparadas em concentrações variando de 0,125 a 2 nM (uma solução de 0 nM que compreende tampão em desenvolvimento sozinho foi incluída como uma referência zero). As amostras foram aleatorizadas e injectadas em

duplicado por 10 minutos cada através de todas as células de 4 fluxos usando-se HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% de Tensioativo P20) como tampão de desenvolvimento. Associações foram observadas como sendo independentes dos índices de fluxo de 1 a 100 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, indicando nenhuma limitação de transporte de massa. Um índice de fluxo de 25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ foi usado para determinar os valores da avidéz. A dissociação do anticorpo foi monitorizada por 10 minutos, a superfície foi regenerada por uma injeção de 12 segundos de H_3PO_4 100 mM (25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$). Os dados brutos foram processados com a utilização do pacote de programas Scrubber (©Biologic Software) e analisados com a utilização do pacote de programas CLAMP (©Biologic Software). Os conjuntos múltiplos de dados de uma superfície única, seis conjuntos de dados de uma vez, foram simultaneamente ajustados globalmente a um modelo de ligação simples Langmuir 1:1 utilizando-se um valor de $R_{\text{máx}}$ de variável comum. O Quadro 5 relaciona os valores da avidéz para os anticorpos anti-ALK-1 representativos da presente divulgação. Os dados representados indicam que os anticorpos preparados de acordo com a divulgação possuem altas afinidades e fortes constantes de ligação quanto a ALK-1 humano.

Quadro 5

Determinação do Valor da Avidéz por Ressonância de Plasmão Superficial (BIAcore)			
Clone	hALK-1/Fc Avidéz (pM)	hALK-1/Fc k_{off} (1/s)	cALK-1fFc Avidéz (pM)
1.12.1 (M29I/D19A)	<6,8	$<5,0 \times 10^{-6}$	27
1.14.2	76	$5,6 \times 10^{-5}$	280
1.27.3	2,9	$1,9 \times 10^{-5}$	60
1.31.1	<13	$<5,0 \times 10^{-6}$	150
1.162.1	18	$1,1 \times 10^{-5}$	62
1.183.2	220	$3,1 \times 10^{-5}$	1800

4.24.2	70	$4,4 \times 10^{-5}$	430
4.38.1	100	$4,0 \times 10^{-5}$	150
4.58.2	40	$1,6 \times 10^{-5}$	130
4.62.1	9,6	$7,6 \times 10^{-5}$	19
4.68.2	86	$3,8 \times 10^{-5}$	320
4.72.2	73	$3,4 \times 10^{-5}$	280
5.13.3	91	$6,3 \times 10^{-5}$	190

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante de mAb 1.12.1 que foi expressa mAb recombinante contendo duas mutações de aminoácidos específicas (metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída por isoleucina e ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve substituída pela alanina).

Exemplo 7. Determinação das Constantes de Afinidade (K_D) das Variantes de Anticorpo Monoclonal 1.12.1 Anti-ALK-1 Completamente Humano Mediante Ressonância de Plasmão Superficial (SPR) com a Utilização de BIACORE™

As medidas de afinidade dos anticorpos anti-ALK-1 purificados por ressonância de plasmão superficial com a utilização do instrumento BIACORE™ 3000 foram realizadas como segue, com a utilização dos protocolos do fabricante.

Para realizar as análises cinéticas, as variantes do anticorpo monoclonal 1.12.1 anti-ALK-1 completamente humano foram imobilizadas sobre a camada de dextrano de um chip biossensor CM5 usando o acoplamento de amina. As superfícies foram preparadas com a utilização do tampão de acetato 10 mM, pH 5,0, como o tampão de imobilização, e as densidades proteicas de 3500 a 4800 RU foram obtidas. A desactivação dos ésteres de N-hidroxissuccinimida não reagidos foi realizada com a utilização de cloridrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. As amostras de ALK-DEC monomérico no tampão em desenvolvimento foram preparadas em concentrações que variaram de 2,63 a 640 mM (uma solução de 0 nM que compreende o tampão em desenvolvimento

isoladamente foi incluída como uma referência zero). As amostras foram aleatorizadas e injectadas por 2 minutos cada através de todas as 4 células de fluxo usando HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% de Tensioativo P20) como tampão de desenvolvimento. Um índice de fluxo de 25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ foi usado para se determinar as constantes de afinidade. A dissociação do ALK-DEC monomérico foi monitorada por 10 minutos, a superfície foi regenerada por uma injeção de 12 segundos de H_3PO_4 100 mM (25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$). Os dados brutos foram processados com a utilização do pacote de programas Scrubber (©BioLogic Software) e analisados com a utilização do pacote de programas CLAMP (©BioLogic Software). Os dados foram ajustados globalmente a um simples modelo de ligação Langmuir 1:1. O Quadro 6 proporciona uma lista das medições da afinidade quanto às variantes do anticorpo monoclonal 1.12.1 anti-ALK-1 humano da presente divulgação.

Quadro 6

<u>Determinação da Constante de Afinidade da Variante</u> <u>1.12.1 de mAb, K_D, por Ressonância de Plasmão Superficial</u> <u>(BIAcore)</u>			
Anticorpo	Associação (M^{-1} s^{-1})	Dissociação (s^{-1})	K_D (nM)
1.12.1	$1,9 \times 10^3$	$7,4 \times 10^{-5}$	39
1.12.1 (tWT)	$2,2 \times 10^3$	$5,8 \times 10^{-5}$	26
1.12.1 (D19A)	$2,6 \times 10^3$	$4,4 \times 10^{-5}$	17
1.12.1 (M29I)	$2,4 \times 10^3$	$9,1 \times 10^{-5}$	38
1.12.1 (M29I/D19A) (1) *	$2,2 \times 10^3$	$9,5 \times 10^{-5}$	43
1.12.1 (M29I/D18A) (2) *	$2,3 \times 10^3$	$8,4 \times 10^{-5}$	37

*As duas constantes de afinidade para 1.12.1 (M29I/D19A) (1) e (2) foram obtidas com a utilização de duas superfícies separadas.

1.12.1 refere-se à variante de 1.12.1 de mAb que foi isolada do hibridoma.

1.12;1(rWT) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi expressa mAb recombinante.

1.12.1 (M29I) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi expressa mAb recombinante contendo uma mutação de aminoácido única específica, em que a metionina na posição 29 na cadeia pesada foi substituída por isoleucina.

1.12.1 (D19A) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi expressa mAb recombinante contendo uma mutação de aminoácido única específica, em que o ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve foi substituído por alanina.

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi expressa mAb recombinante contendo duas mutações de aminoácido específicas (a metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída por isoleucina e ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve substituída por alanina).

Exemplo 8. Determinação das Constantes de Afinidade (K_D) dos Anticorpos Monoclonais Anti-ALK-1 Completamente Humanos pela Ressonância de Plasmão Superficial (SPR) com a Utilização de BIACORE™

As medidas de afinidade (K_D e k_{off}) dos anticorpos anti-ALK-1 purificados por ressonância de plasmão superficial com a utilização do instrumento BIACORE™ 3000 foram realizadas como segue, com a utilização dos protocolos do fabricante.

Para realizar as análises cinéticas, mAbs purificados por afinidade foram imobilizados sobre camada de dextrano de um chip biossensor CM5 com a utilização do acoplamento

de amina. As superfícies foram preparadas com a utilização do tampão de acetato 10 mM, pH 5,0, como o tampão de imobilização, e as densidades proteicas de 200 a 400 RU foram obtidas. A desactivação dos ésteres de N-hidroxissuccinimida não reagidos foi realizada usando-se cloridrato de etanolamina 1 M, pH 8,5. As amostras de ALK-DEC monoméricas em tampão de desenvolvimento foram preparadas nas concentrações variando de 3,125 a 400 nM (uma solução de 0 nM que compreende apenas tampão de desenvolvimento foi incluída como uma referência zero). As amostras foram aleatorizadas e injectadas em duplicata por 2 minutos cada através de todas as 4 células de fluxo usando-se HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% de Tensioativo P20) como tampão de desenvolvimento. As associações foram observadas como sendo independentes dos índices de fluxo de 1 a 100 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, indicando nenhuma limitação de transporte de massa. Um índice de fluxo de 25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ foi usado para determinar as constantes de afinidade. A dissociação do ALK-DEC monomérico foi monitorada por 10 minutos, a superfície foi regenerada por uma injeção de 12 segundos de H_3PO_4 100 mM (25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$). Os dados brutos foram processados com a utilização do pacote de programas Scrubber (©BioLogic Software) e analisados com a utilização do pacote de programas CLAMP (©BioLogic Software). Os dados foram ajustados globalmente a um simples modelo de ligação Langmuir a 1:1. O Quadro 7 proporciona uma lista das medições de afinidade quanto aos anticorpos anti-ALK-1 representativos da presente divulgação:

Quadro 7

<u>Determinação da Constante de Afinidade, K_D, para os Anticorpos Monoclonais Representativos mediante a Ressonância de Plasmão Superficial (BIAcore)</u>			
Anticorpo	Associação ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Dissociação (s^{-1})	K_D (nM)

1.12.1 (M29I/D19A)	$3,3 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{-4}$	25
1.31.1	$3,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^{-4}$	6,0
4.72.1	$3,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^{-5}$	0,8
Fab 1.12.1 (M29I/D19A)	$3,8 \times 10^4$	$8,2 \times 10^{-4}$	22

O ALK-DEC monomérico usado para gerar os dados no Exemplo 8 foi uma preparação diferente daquela usada para gerar os dados do Exemplo 7.

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante de 1.12.1 de mAb que foi expressa como mAb recombinante contendo duas mutações de aminoácidos específicas mencionadas acima (ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve substituída por alanina e metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída por isoleucina).

Fab 1.12.1 (M29I/D19A) refere-se ao fragmento de Fab de 1.12.1 (M29I/D19A) de mAb preparado por digestão de 1.12.1 (M29I/D19A) IgG1 com a utilização de papaína.

Exemplo 9. Identificação da Selectividade dos Epítomos dos Anticorpos Anti-ALK-1

As experiências de competição cruzada foram realizadas com a utilização do instrumento BIACORE™ 3000 (Biacore International AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, N.J.), seguindo-se os protocolos do fabricante.

A químera de ALK-1/FC humana recombinante foi imobilizada sobre a camada de dextrano de um chip biossensor CM5 usando o acoplamento de amina. Os chips foram preparados com a utilização de tampão de acetato 10 mM, pH 5,0, como o tampão de imobilização, e uma densidade proteica de 940 RU foi obtida. A desactivação dos ésteres de N-hidroxissucinimida foi realizada com a utilização de cloridrato de etanolamina 1 M, pH 8,5.

Os mAbs purificados foram diluídos a uma concentração

de 50 nM em tampão de desenvolvimento HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% de Polissorbato 20). Um anticorpo primário foi escolhido e depois injectado através da célula de fluxo por 600 segundos numa velocidade de 10 µl/minuto. Após a injeção ter sido completada, um anticorpo secundário foi escolhido e injectado através da mesma célula de fluxo por 600 segundos numa velocidade de 10 ml/minuto. A superfície do sensor foi regenerada por uma injeção de 12 segundos de H₃PO₄ (25 µl/minuto).

Após a regeneração, o anticorpo primário foi novamente injectado através da célula de fluxo por 600 segundos, numa velocidade de 10 µl/minuto. Após a injeção estar completa, um diferente anticorpo secundário foi escolhido e injectado através da mesma célula de fluxo por 600 segundos numa velocidade de 10 µl/minuto. Uma vez o painel inteiro de 14 anticorpos ter sido usado como o anticorpo secundário, um novo anticorpo primário foi escolhido e o procedimento foi repetido com o novo anticorpo primário. Estes procedimentos foram realizados até que todas as combinações possíveis dos anticorpos primários e secundários tivessem sido injectados através da célula de fluxo. A ligação do anticorpo secundário foi considerada como tendo ocorrido se a resposta total observada após a injeção de ambos os anticorpos excedesse aquela observada para ambos os valores limites possíveis. Os valores de limite foram determinados pela utilização do mesmo anticorpo, tanto o anticorpo primário quanto o anticorpo secundário. Apresentada no Quadro 8, uma matriz de resposta foi criada com base em se a ligação foi observada: -indica nenhuma ligação do anticorpo secundário, x indica que a ligação foi observada (a resposta foi maior do que os valores limites para os anticorpos individuais). O agrupamento dos clones que apresentam o mesmo padrão de reactividade dá origem a duas caixas de epítomos diferentes com 1.11.1 numa caixa e todos os outros anticorpos na outra caixa.

Quadro 8. Matriz de Resposta de Armazenamento de Epítopo BIAcore.

mAb Primário	mAb Secundário													
	1.9 .1	1.11 .1	1.12.1 (M29I /D19A)	1.27 .3	1.31 .1	1.162 .1	1.183 .2	4.24 .2	4.38 .1	4.58 .2	4.62 .1	4.68 .2	4.72 72	5.13 13
1.9.1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.11.1	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1.12.1 (M29I/D1 9A) "		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.27.3	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.31.1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.162.1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.183.2	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.24.2	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.38.1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.58.2	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.62.1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.68.2	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.72	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.13	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Exemplo 10. Isolamento do Gene ALK-1 do Macacos Cinomolgos

O gene ALK-1 de macacos Cinomolgos ("Cino") foi extraído do tecido dos pulmões do Cino. Com base na sequência de genes publicado em para o ALK-1 humano (registo do Genbank L17075), os iniciadores foram projectados para amplificar por PCR o ALK-1 de Cinomolgos de comprimento completo. O ARNm foi preparado do tecido do pulmão do cinomolgo extraído congelado (cerca de 1 g), com a utilização do *kit* de purificação de ARNm (Ambion, N° de Catálogo 1915) de acordo com as instruções do fabricante. 200 ng do ARNm foi submetido a transcrição reversa e amplificado por PCR com a utilização do *kit* OneStep RT-PCR

(Qiagen, N° de Catálogo 210210), utilizando os oligos específicos do gene: 5'-AGCGGGCCCAGAGGGACCA**ATG** (SEQ ID NO: 115) (directo) e 5'-CAGAAAGGAATCAGGTGCTCCTGGG**CTA** (SEQ ID NO: 116) (reverso) numa temperatura de revenimento de 61° C. Um produto da RT-PCR do tamanho apropriado (~1,5 Kb) foi extraído e purificado de um gel de agarose a 0,9% após a electroforese, depois TOPO-TA foi clonado no vector pCR4-TOPO (Invitrogen, N° de Catálogo K4575-01). O inserto foi sequenciado para se obter a sequência de nucleótidos ORF do ALK-1 do Cinomolgo. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos traduzidos previstos são apresentadas nas SEQ ID NOs: 93 e 94, respectivamente. Embora a porção citoplasmática do gene codifique as sequências proteicas idênticas entre o Cino e o ser humano, existem cinco diferenças de aminoácidos no domínio extracelular (DEC, que inclui as posições 22 a 118) e 1 diferença de aminoácidos no domínio da transmembrana da proteína. A identidade da sequência do DEC entre seres humanos e Cino, é de 94,8%. Um alinhamento do DEC humano e dos primatas é apresentado na figura 2.

Um par de iniciadores (direto: 5'-GATTATGGCCTTGGGCTCCCCCAGGAAA (SEQ ID NO: 117) e reverso: 5'-GGGCTATTGAATCACTTTAGGCTTCTCTGGACTGTTG) (SEQ ID NO: 118) foi usado para amplificar em PCR o gene ALK-1 de Cinomolgos de comprimento completo.

Exemplo 11. Determinação das Características de Ligação da Superfície Celular e Hibridação Cruzada de Primatas Mediante Citometria de Fluxo (FACS)

Para gerar as linhas celulares que sobre-expressam ALK-1, as quais podem ser usadas para testar a afinidade de ligação anti-ALK-1 usando a citometria de fluxo (FACS), genes ALK-1 de comprimento completo humanos, de Cinos e de ratos foram clonados no vector pcDNA5/FRT/To TOPO da Invitrogen (N° de Catálogo K6510-20) e transfectados em 293 células hospedeiras Flp-In T-Rex (Invitrogen, N° de

Catálogo R780-07), respectivamente. As selecções foram realizadas usando-se higromicina para se obter as linhas celulares finais estáveis. As sobre-expressões das proteínas de ALK-1 de comprimento completo respectivas foram obtidas por indução de tetraciclina (2 µg/ml) em 37 °C/5% de CO₂ por 24 horas.

Os mAbs anti-ALK-1 foram testados quanto às suas afinidades de ligação ao ALK-1 da superfície celular usando o ensaio FACS, usando-se 293 células estáveis que sobre-expressam as proteínas ALK-1. As células foram separadas com a utilização de tripsina-EDTA e lavadas com PBS-AS frio. Após terem sido separadas em alíquotas nas placas de 96 poços, as células foram bloqueadas por soro e incubadas com diferentes concentrações de mAb específico por 1 hora a 4 °C. Subsequentemente, as células foram lavadas e incubadas com um anticorpo secundário k anti-humano conjugado com o fluoróforo R-PE antes analisado com a utilização de um citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). 10.000 eventos foram colhidos para cada amostra sem se aplicar qualquer obstrução. Como mostrado no Quadro 9, a média geométrica de cada histograma de amostra foi representada graficamente como uma função da concentração de mAb, e K_D foi calculado para cada mAb após ajuste a um modelo de equilíbrio de duas situações. Exemplos das experiências de FACS equivalentes de seres humanos e de primatas são apresentados na figura 3.

Quadro 9

<u>Resultados de Afinidade de Ligação Média (K_D) dos Anticorpos Monoclonais Anti-ALK-1 ao ALK-1 da Superfície Celular Humano ou de Cino Medida por FACS</u>		
Anticorpo	K_D (nM)	
	Humano	Cino
1.12.1	6,7	2,0
1.27.1	3,7	2,2
1.162.1	5,6	3,0

4.38.1	9,3	3,4
4.58.1	14,0	6,7
4.72.1	6,4	3,8
5.13.1	3,2	1,6
1.31.1	3,2	1,7
4.24.1	7,6	3,1
4.62.1	2,3	0,78
4.68.1	8,4	9,0

Além disso, 1.12.1 foi apresentado pelo ensaio de FACS como tendo cruzamento muito limitado a rato ($K_D > 100$ nM) e é prognosticado como tendo cruzamento muito baixo a ratinhos, em vista da identidade de sequência de DEC de 74% e 68% entre o ALK-1 de rato/humano e de ratinho/humano, respectivamente.

O ensaio de FACS foi também usado para se determinar K_D das variantes de mAb 1.12.1 recombinante. No Quadro 10, os resultados indicam afinidade de ligação semelhante do anticorpo recombinante.

Quadro 10

Resultados da Afinidade de Ligação Média das Variantes ao ALK-1 Humano ou de Cino da Superfície Celular Medidos por FACS		
Anticorpo	K_D (nM)	
	Humano	Cino
1.12.1	6,7	2,0
1.12.1 (rWT)	5,9	6,0
1.12.1 (M29I)	6,0	3,3
1.12.1 (D19A)	5,7	3,8
1.12.1 (M29I/D19A)	7,2	3,4
Fab 1.12.1 (M29I/D19A)	0,77	ND
1.12.1 refere-se à variante de 1.12.1 de mAb que foi isolada do hibridoma.		
1.12.1 (rWT) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi		

expresso mAb recombinante.

1.12.1 (M29I) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi expressa mAb recombinante contendo uma mutação única específica de aminoácido em que a metionina na posição 29 na cadeia pesada foi substituída por isoleucina.

1.12.1 (D19A) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi expressa mAb recombinante contendo uma mutação única específica de aminoácido em que o ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve foi substituído por alanina.

1.12.1 (M29I/D19A) refere-se à variante 1.12.1 de mAb que foi expressa mAb recombinante contendo duas mutações de aminoácido específicas (metionina na posição 29 na cadeia pesada substituída por isoleucina, e ácido aspártico na posição 19 na cadeia leve substituída por alanina).

Fab 1.12.1 (M29I/D19A) refere-se ao fragmento Fab de 1.12.1 (M29I/D19A) de mAb preparado por digestão de IgG1 de 1.12.1 (M29I/D19A) com a utilização de papaína.

Exemplo 12. Ensaio de Taqman para Id1

HUVECs (Biowhittaker, N° de Cat. CC-2519) foram semeados sobre placas de 24 poços, 12000 células/poço em 600 µl de meio HUVEC completo (kit EGM-2 Bullet, Biowhittaker, N° de Cat. CC-3162), e deixados semear durante a noite. No dia seguinte, as células foram tipicamente 50% confluentes. O Meio Completo foi removido e 200 µl de Meio de Inanição (EBM-2 com 0,2% de FBS apenas) foram adicionados. As células foram incubadas por 2 horas. Depois, as células foram tratadas com 40 µl da solução de anticorpo em PBS. Ab liofilizado foi reconstituído com PBS estéril. Finalmente, as células foram tratadas com 1% de FBS/meio Basal (concentrações finais) por 30 minutos, o meio foi removido e as células foram lisadas em 400 µl de

Tampão de RTL (kit RNeasy 96, Qiagen, N° de Cat. 74182), de acordo com os protocolos do fabricante. Subsequentemente, o ARN foi preparado com a utilização do *kit* RNeasy (de acordo com instruções do fabricante). O ARN foi eluído e quantificado com o *kit* de Quantificação de ARN RiboGreen® (Molecular probes, N° de Cat. R-11490). Quantidade igual do ARN total foi usada para a análise de PCR de tempo real para detectar a expressão de ARN de Id1 (instrumento ABI 7900). A PCR foi conduzida com a utilização do *kit* Taqman One Step PCR Master Mix (ABI, N° de Cat. 4309169) e as sequências de iniciador de ID1/Sonda listadas a seguir. A PCR foi conduzida com a utilização de 40 ciclos do revenimento a seguir e condições de amplificação: 95 °C, 15 segundos; 60 °C, 1 minuto.

Sonda TaqMan: 5'-6-FAM conjugado a CPG, e 3'-TAMRA. Nome: Sonda ID1

Sequência: 5' CCAGCACGTCATCGACTACATCAGGGA 3' (SEQ ID NO: 119)

Iniciadores de PCR Taqman:

Nome: ID1-F

Sequência: 5' AAGGTGAGCAAGGTGGAGATTC 3' (SEQ ID NO: 120)

Nome: ID1-R

Sequência: 5' TTCCGAGTTCAGCTCCAACTG 3' (SEQ ID NO: 121)

Os exemplos das titulações de Id1 para a molécula condutora de 1.12.1(M29I/D19A) (incluindo as variantes das sequências de 1.12.1) e o derivado de Fab são mostrados nas figuras 4 e 5.

Um sumário dos valores médios de CI_{50} para este ensaio é apresentado no Quadro 11. Todas as determinações de CI_{50} foram desenvolvidas em triplicata.

Exemplo 13. Fosforilação de Smad1 Detectada pelo Sistema de Formação de Imagem de Infravermelho Odyssey da Biosciences LI-COR (placa de 24 poços)

HUVECs (Biowhittaker, N° de Cat. CC-2519) foram semeados sobre placas de 24 poços, 18000 células/poço em

600 µl de meio HUVEC completo (kit EGM-2 Bullet, Biowhittaker, N° de Cat. CC-3162), e deixados em cultivo durante a noite. No dia seguinte, as células estavam tipicamente 50% confluentes. O Meio Completo foi removido e 200 µl de Meio de Inanição (Meio de Inanição: EBM-2 com 0,2% de FBS apenas) foram adicionados. As células foram incubadas por 2 horas. Depois, as células foram tratadas com 40 µl da solução de anticorpo em PBS por 3 horas. Finalmente, as células foram tratadas com 0,3X de Meio Completo (concentração final) por 35 minutos. O meio foi removido, e as células foram lisadas em 80 µl de 1,1X Tampão de Amostra (Invitrogen, N° de Cat. NP0007). Smad1 fosforilado foi determinado por Western Blotting usando-se X Cell Surelock Mini-Cell & Blot Module (Invitrogen, N° de Cat. EI0002). O Smad1 fosforilado foi detectado com a utilização do anticorpo anti-fosfor-Smad1 de coelho (Sinalização Celular, N° de Cat. 9511), que é então detectado por IgG AntiCoelho Conjugado IRDye® 800 (Rockland Immunochemicals, N° de Cat. 611-732-127). A quantidade de Smad1 fosforilado foi quantificada com a utilização do Imageador Infravermelho Odyssey (Li-Cor). Actina (Santa Cruz, N° sc-8432) foi usada para a normalização (anti-ratinho Alex 680, Molecular Probe, N° de Cat. A-21058). Um resumo dos valores médios de CI_{50} para este ensaio é mostrado no Quadro 11. Todas as determinações de CI_{50} foram desenvolvidas em triplicata.

Quadro 11

Clone	ID1 Taqman CI_{50} nM	pSmad1 Western CI_{50} nM
1.11.1	nd	nd
1.12.1 (M29I/D19A)	16	18
1.13.1	100	87
1.27.1	82	70
1.29.1	94	82

1.31.1	24	21
1.162.1	75	15
1.183.1	58	17
4.24.1	100	82
4.38.1	87	52
4.58.1	14	15
4.62.1	24	34
4.68.1	141	110
4.72.1	21	35
5.13.1	30	68

Exemplo 14. Características de Internalização dos Anticorpos Monoclonais Anti-ALK-1

FACS foi usado para monitorizar o decurso de tempo do ALK-1 receptor da superfície das células remanescente, bem como o anticorpo neutralizante. O ALK-1 remanescente da superfície celular é monitorado por um anticorpo marcador que é capaz de ligar-se ao ALK-1 da superfície celular reconhecendo ainda um epítipo diferente do anticorpo neutralizante. Um mAb de DEC ALK anti-humano de ratinho (R&D systems, N° de Cat. AF310) foi identificado e usado no estudo como o anticorpo marcador.

O decurso de tempo da internalização foi estudado com a utilização das linhas de células endoteliais HUVEC e HUAEC. As células foram cultivadas em 37 °C com 5% de CO₂ em placas de 24 poços contendo 200 µl de meio de cultura completo por poço. Em cada 11 pontos do tempo no decurso de 48 horas, 2 µl de uma solução de 1 mg/ml de anticorpo foram adicionados a um poço e misturados (a concentração final do anticorpo neutralizante é de 10 µg/ml). A placa foi então colocada de volta na incubadora em 37 °C até o ponto do tempo de 0 hora, quando a placa foi colocada sobre gelo para interromper o processo de internalização. O anticorpo marcador foi adicionado aos poços neste ponto (concentração final de 10 µg/ml) e incubado sobre gelo por 1 hora. As

células foram então lavadas com PBS separado por tripsinação e transferidas para uma placa de 96 poços. As células foram então lavadas, bloqueadas e tratadas com anticorpos secundários carregando diferentes fluoróforos a fim de monitorizar tanto o anticorpo neutralizante quanto o ALK-1 receptor remanescente sobre a superfície celular. As amostras foram ensaiadas num instrumento de citometria de fluxo FACSCalibur, contando-se 3.000 a 5.000 eventos/amostra. A Média Geométrica de cada amostra no canal de fluorescência específico foi calculada e representada em gráfico como uma função do tempo. Os dados foram ajustados a uma equação de radio-desintegração modificada para se obter o meio-tempo ($t_{1/2}$) da internalização, bem como o percentual do anticorpo neutralizante ou ALK-1 receptor remanescente sobre a superfície celular quando a internalização alcançasse o estado de equilíbrio. Como mostrado na figura 6, 1.12.1(M29I/D19A) de mAb internaliza na mesma velocidade e na mesma extensão do ALK-1 receptor da superfície celular. A meia-vida da internalização de 1.12.1(M29I/D19A) é de -2 horas. Um equilíbrio foi alcançado quando 50% do anticorpo foi internalizado. Um anticorpo policlonal comprado da R&D systems (Nº de Cat. AF370) internaliza num $t_{1/2}$ de 1 hora e alcança o estado de equilíbrio com -70% do receptor sendo internalizado (figura 6). Características de internalização similares foram observadas com outros mAbs anti-ALK-1 humanos da divulgação (não mostrados).

Exemplo 15. Estabelecimento do Prepúcio Humano -Ratinhos Quiméricos SCID

Modificação significativa do procedimento de cirurgia foi feita a um procedimento anteriormente publicado por H-C Yan *et al* "Human/Severe Combined Immunodeficient Mouse Chimeras, An Experimental *In vivo* Model System to Study the Regulation of Human Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecules", J. Clin. Invest. 91: 986, 1993; J. Varner

"Regulation of Angiogenesis *in vivo* by Ligation of Integrin $\alpha 5\beta 1$ with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin" Amer. J. Path. 156 (4): 1345, 2000; K. Tahtis *et al* "Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" Mol. Cancer. Ther. 2(8): 729, 2003. Após a chegada do National Disease Research Institute and Cooperative Human Tissue Network, peças do prepúcio humano foram preparadas de regiões doentes e transferidas para meio de RPMI (Cellgro/Mediatech, N° de Cat. MT-15-040-CV suplementado com Penicilina e Estreptomicina (Gibco/Life Tech, N° de Cat. 15070-063) (adição de 5 ml da solução do *stock* de pen/strep em 500 ml de RPMI). Com a utilização de um escalpelo e cortando-se em placa de petri estéril, as peles foram preparadas numa forma oval de aproximadamente 8x13 mm limpando-se quaisquer extremidades desiguais e tecidos conectivos, e armazenadas sobre gelo húmido antes da cirurgia. O volume apropriado (4 μ l/grama do animal) de solução de 100 mg/ml de Cetamina (Ketaset^{TR}, Fort Dodge Animal Health)/1 mg/ml de medetomidina (Pfizer Animal Health -Dormitor) foi injectado por via intraperitoneal no abdómen de ratinhos scid (isto é, num ângulo de 45°, sob a pele, porém não muito profundo internamente). Uma vez anestesiados, os ratinhos receberam com lubrificante ocular, uma injeção subcutânea de Cetoprofeno (10 mg/kg, Fort Dodge Animal Health) e o pelo foi raspado sobre o local da cirurgia. A região cirúrgica foi cirurgicamente esfregada por três vezes com a utilização de Clorhexidina (Butler, Chclo-Scrub 40, N° de cat. WAB20109) e depois álcool num movimento, circular que se iniciou do centro do local cirúrgico para fora, e evitou-se ir de uma área suja de volta para uma área limpa. Os ratinhos foram transferidos para a cobertura cirúrgica preparada e colocados sobre uma almofada de água aquecida (Gaymar

Industries, N° de Cat. TP500 T/Pump) que foi mantida em 37 °C. Os ratinhos foram então colocados sob anestesia de isofluorina durante a duração da cirurgia. O lado dorsal de um ratinho foi coberto com um campo cirúrgico cortado para expor o local de cirurgia. A pele do ratinho foi levantada com fórçipes e um tecido de pele de conformação oval foi cortado com tesouras curvas com um movimento. Um prepúcio humano de dimensão apropriada foi colocado sobre o ratinho. A pele humana e a do ratinho foram suturadas entre si com a utilização da sutura Ethilon (Ethicon N° de Cat. 697H), iniciando-se em cima do oval, depois no fundo, depois do lado direito mais distante e depois do lado esquerdo mais distante. Mais suturas foram feitas no meio para ainda segurar os tecidos entre si. Aproximadamente 8 suturas foram feitas a igual distância ao redor da pele. Durante a cirurgia, usou-se uma seringa com solução salina estéril para irrigar o ferimento cirúrgico da pele/ratinho quando ela se tornava seca. Um penso-rápido foi colocado sobre o ferimento. Um penso transparente (3M Tegaderm™) foi então usado para livremente ser enrolado ao redor da bandagem. O penso foi cortado no tamanho para cobrir uma área levemente mais ampla do que o penso-rápido. Foi dado ao ratinho então Atipamezole (50 a 100 µl, Pfizer Animal Health - Antisedan), e o ratinho foi restabelecido numa gaiola aquecida em 5 a 10 minutos. O penso e as bandagens foram removidos em 7 a 10 dias e pelo 15^a dia a maioria das peles pareciam crostas. A cura completa ocorreu entre 21 a 28 dias, após cujo tempo as peles estavam prontas para serem inoculadas com as células tumorais. É mostrado na figura 8 um exemplo da análise histológica (Coloração de H & E) de uma secção da pele enxertada após a cirurgia. A histologia da pele enxertada imita exactamente as características da pele humana implantada nos ratinhos descritos por Tahtis *et al.*, "Expression and Targeting of Humano Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined

Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" Mol. Cancer. Ther. 2(8): 729, 2003. h.e.: camada epidérmica humana; h.d.: camada dérmica humana.

Exemplo 16. Modelo de Colagénio no Prepúcio Humano - Ratinhos Quimera SCID

Solução de *stock* Colagénio I (N° de Cat. 354236, Becten-Dickinson) foi diluída a 4 mg/ml com ácido acético 0,02 N e foi mantida sobre gelo antes da implantação. A solução de colagénio ácida (8 partes) foi misturada com 10X M199 (Sigma, N° de Cat. M9163) (1 parte) e fibronectina (Fn) plasmática humana (N° de Cat. 354008, Becten-Dickinson) para se alcançar uma concentração final Fn de 90 µl/ml; NaOH (1,0 N) foi adicionado para ajustar o pH em ~ 7,2. A mistura de colagénio/Fn foi mantida sobre gelo até a utilização. A mistura de implante foi preparada com a utilização da mistura acima de Colagénio/Fn mais o inibidor angiogénico de interesse com ou sem células endoteliais macrovasculares humanas (HMVEC) (Cascade Biologics, N° de Cat. C-010-5C). As HMVECs foram preparadas como 6×10^6 células/ml em PBS. 50 a 100 µl da mistura de implante foram injectados intradermicamente dentro do prepúcio no ratinho quimera scid. 7 a 14 dias mais tarde, os tampões de colagénios foram colhidos, implantados no composto OCT (N° de Cat. 4583, Sajura Finetek, CA) e o encaixe congelado para análise imunohistoquímica. O tampão de colagénio no prepúcio foi identificado com o *kit* Trichrome (N° de Cat. KC1641, Mater Tech, CA) como coloração azul, como mostrado na figura 9 (AX., Qs vasos humanos foram identificados por coloração por P-CAM humano usando-se o anticorpo CD-31 anti-humano (Clone 13.3, Vector Laboratories) (Figure 9 (B). O Quadro 12 proporciona um resumo do coloração dos vasos humanos e da quantificação no modelo de colagénio no prepúcio -ratinhos quimera SCID.

Quadro 12. Resumo dos Resultados do Modelo de Colagénio

Matriz	HMVEC na Matriz	Tratamento (Rx)	Dias de Rx	Ponto Final do Estudo	Classificação dos vasos de ser humano (1 $\times 10^3$)	% de Controlo (vasos humanos)
1,6 mg/ml de Colagénio	Nenhum	Nenhum tratamento	4	Coloração de CD-31 humano	0,036 \pm 0,001	40
1,6 mg/ml de Colagénio	7 $\times 10^3$	Nenhum tratamento	4		0,071 \pm 0,022	78
1,6 mg/ml de Colagénio	1,4 $\times 10^4$	nenhum tratamento	4		0,063 \pm 0,016	69
2,4 mg/ml de Colagénio	Nenhum	Nenhum tratamento	4		0,091 \pm 0,056	100
2,4 mg/ml de Colagénio	7 $\times 10^3$	Nenhum tratamento	4		0,067 \pm 0,049	74
2,4 mg/ml de Colagénio	1,4 $\times 10^4$	Nenhum tratamento	4		0,062 \pm 0,047	68
3,0 mg/ml de Colagénio	8,8 $\times 10^3$	Nenhum tratamento	4	Coloração de CD-31 humano	54 \pm 9	100
3,0 mg/ml de Colagénio	8,8 $\times 10^3$	Anticorpo de controlo do isotipo 100 $\mu\text{g/ml}$ misturado em gel	4		52 \pm 13	96

3,0 mg/ml de Colagénio	$8,8 \times 10^3$	1.12.1 (M29I/ D19A) anticorpo 100 µg/ml misturado em gel	4		15 ± 3	28
3,0 mg/ml de Colagénio	nenhum	nenhum tratamento	4	Coloração de CD-31 humano	$0,112 \pm 0,026$	100
5,0 mg/ml de Colagénio	nenhum	nenhum tratamento	4		$0,031 \pm 0,012$	28
3,0 mg/ml de Colagénio	nenhum	Anticorpo de controlo do isotipo 100 µg/ml, Injecção id.	4	Coloração de CD-31 humano	75 ± 15	100
3,0 mg/ml de Colagénio	nenhum	1.12.1 (M29I/ D19A) anti- corpo 100 µg/ml, injecção id.	4		39 ± 11	52
-3,0 mg/ml de Colagénio	nenhum	1.14.1 anticorpo 100 µg/ml, injecção id	4		44 ± 28	59

Exemplo 17. Modelo de Tumor M24MET no Prepúcio Humano -
Ratinhos Quimera SCID

Tipicamente, os enxertos de idade entre 5 a 10 semanas após a cirurgia foram usados nestes estudos. A linha de células M24met foi descrita por Mueller e colaboradores, em "Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells", Cancer Research, 55(8): 1629-1632, 1995. A suspensão de

células M24met foi preparada como se segue: 80% de células M24met confluentes foram lavados, tripsinizados com a utilização de Tripsina/EDTA (Gibco, N° de Cat. 25200-056) e colhidos no meio PRMI (Cellgro/Mediatech, N° de Cat. MT-15-040-CV) suplementado com 10% de FBS (Cellgro/Mediatech, N° de Cat. AKD-11775) e L-glutamina 2 mM (Cellgro/Mediatech, N° de Cat. 25-005-CI). As células foram centrifugadas em 600 rpm por 5 minutos, recolocadas em suspensão em PBS estéril. As contagens celulares foram estimadas com a utilização do Contador Coulter (Beckman Coulter, Modelo Z2). As células foram centrifugadas em 600 rpm por 5 minutos e foram recolocadas em suspensão em mistura de Colagénio e Fn (3 mg/ml) para se obter uma suspensão de 4×10^7 células/ml de suspensão celular para implantação.

Para inocular, 2×10^6 das células acima foram injectadas (50 µl de 4×10^7 células/ml) intradermicamente na pele humana enxertada no ratinho. Nos dias 5 a 7 após o implante, os tumores estavam palpáveis e os ratinhos foram aleatorizados dentro dos grupos de Controlo e de Tratamento antes que a dosagem iniciasse. O grupo de Controlo é definido como aquele em que os animais devem receber ou nenhuma dose, a dose do Veículo em que o anticorpo anti-ALK-1 foi constituído, ou a dose do isótopo combinado com o anticorpo anti-KLH monoclonal humano IgG₂ (Pfizer Inc). O grupo de Tratamento é definido como aquele em que os animais devam receber uma dose do anticorpo 1.12.1 (M29I/D19A) anti-ALK-1.

Exemplo 18. Coloração Dual de Imunofluorescência (IF) de CD-31 Humano e de Ratinho

As secções de tecido congelado foram secas ao ar e fixadas em -20 °C em acetona (Fisher, N° de Cat. A16S-4), ou 10 minutos. As amostras foram secas ao ar novamente e lavadas em PBS três vezes em 5 minutos cada. As amostras foram bloqueadas em 5% de soro de coelho (Vector Laboratories, N° de Cat. S-5000) em PBS por 30 minutos na

temperatura ambiente. A mistura de anticorpo primária foi preparada em 5% de soro de coelho com o anticorpo CD-31 anti-humano (Santa Cruz, N° de Cat SC1505) e o anti-ratinho CD-31 (Pharmingen, Clone Mec1 3.3, N° de Cat 01951 A) em diluições de 1:100 e 1:150, respectivamente. A mistura de anticorpos acima foi adicionada às amostras de tecido por 1 hora em TA. Os blocos foram lavados em PBS por três vezes a 5 min cada antes de incubados com a mistura de anticorpo secundária por 1 hora em TA. A mistura de anticorpo secundária foi preparada em PBS/0,05% Tween-20 (Sigma, N° de Cat P1379), anticorpo anti-cabra de coelho Vermelho do Texas (Jackson Labs, N° de Cat 305-075-003) e anticorpo anti-rato de coelho FITC (Jackson Labs, N° de Cat 312-095-003). Os anticorpos eram diluídos a 1 : 50 se anticorpos fossem usados ou a 1: 100 se os anticorpos frescos fossem usados. As lâminas foram lavadas novamente em PBS por três vezes a 5 min cada, antes de fixadas em Vectashield (Hard Set, meio de Montagem com DAPI, Vector Lab, CA, N° de Cat H-1500). As lâminas foram mantidas no escuro e 4 °C até análise da imagem. A análise da imagem foi realizada usando-se um microscópio fluorescente BX60 Olympus e as fotografias foram tiradas usando-se uma máquina fotográfica colorida digital microfire Olympus. As fotografias de 3-5 pontos/lâmina quentes, uma lâmina/animal, 4 -7 animais/grupo foram tiradas e as áreas do vaso como indicado por coloração positiva de CD-31 anti-humano, foram quantificadas por três indivíduos usando-se Image Pro Plus v4.5 (MediaCybernetics). O ponto extremo farmacodinâmico (média de grupo) foi expresso como a percentagem de inibição CD-31 humana, em comparação com o grupo de Controlo ou como área de vaso humano total. A significância estatística foi determinada por ANOVA. É mostrada na figura 10 uma imagem imunofluorescente de vasos humanos (vermelho) e de ratinho (verde) do tumor M24met do recipientes de ratinho (vermelho) e vasos (verdes) do tumor M24met do

ratinho quimérico SCID do prepúcio humano.

Exemplo 19. Coloração Imunohistoquímico (IHC) de CD-31 Humanos

As secções de tecido congelado foram secas ao ar e fixadas a -20 °C em acetona por 10 min. As amostras foram secas ao ar novamente e levadas em PBS duas vezes a 5 min cada. As amostras foram incubadas em 0,075% H₂O₂/ metanol (Fisher N° de Cat A433-4) por 15 min e lavadas em PBS três vezes a 5 min cada. As amostras foram bloqueadas em soro de coelho/PBS por 30 min e aplicadas com anticorpo CD-31 anti-humano 1:100 (Santa Cruz, N° de Cat SC1505) em 5% de soro de coelho por 1 hora em TA. As amostras foram lavadas em PBS duas vezes a 5 min cada e aplicadas com anti-cabra de coelho a 1:200 (Vector Labs, N° de Cat BA-5000) em 5% de soro de coelho por 35 min em TA. As lâminas foram então lavadas em PBS duas vezes a 5 min cada e estreptavidina recentemente produzida (Vector Labs, ABC Elite kit, N° de Cat PK-6100) foi adicionada. As lâminas foram lavadas novamente em PBS duas vezes a 5 min cada e então reveladas em diaminobenzidina (DAB) (Vector Labs, N° de Cat SK-4100). As lâminas foram lavadas em PBS duas vezes a 5 min cada, seguido por hematoxilina de Mayers (Sigma, N° de Cat HHS-32) por 5 segundos. As amostras foram bem enxaguadas em diH₂O e imersas duas vezes brevemente na solução de hidróxido de amónio (*stock* 5 ml em 1L de diH₂O) (Sigma, N° de Cat A-6899) e enxaguadas em diH₂O novamente. As amostras foram então desidratadas em álcool de 70%, 90% e então 100% (Harleco, N° de Cat 65347/85) 1 minuto cada e finalmente em xileno (JT Baker: N° de Cat 51.6,09). As lâminas foram fixadas com Cytoseal 60 (Stephens Scientific, Cat #8310-4,) e cobertas com lamelas cobre-objects para análise de imagem. É mostrada na figura 11 a imagem IHC de vasos humanos (castanho) do tumor M24met do ratinho quimérico SCID-prepúcio humano.

Exemplo 20. Tratamento Terapêutico com o Anticorpo Anti-

ALK-1 1.12.1 (M29I/D19A)

Para o tratamento, a dosagem foi realizada subcutaneamente (sc) ou intravenosamente (iv). Tipicamente, uma dose do anticorpo 1.12.1 (M29ID19A) foi dada para cada estudo. A segunda dose do anticorpo ALK-1, se necessário, foi administrada no dia 9 ou 10. Algumas vezes múltiplos níveis de dose, isto é, 1,5, 10, 50 mg/kg, foram administrados para investigar a inibição dependente de dose do crescimento de vaso humano. Os animais foram monitorados diariamente e os tumores foram medidos três vezes/semana por calibres. Pelo dia 14 -17 os tumores estavam entre 250 -350 mm³ e foram removidos dos ratinhos, embebidos em OCT e congelados para análise IF ou IHC. São mostradas nas figura 12 imagens imunofluorescentes representativas de vasos humanos (vermelho) e de ratinho (verde) dos tumores M24met de Controlo e 1.12.1(M29I/D19A) tratados (10 mg/kg) no ratinho quimérico de SCID de prepúcio humano. Inibição dependente da dose de vasos tumorais humanos por 1.12.1 (M29I/D19A) em modelo de ratinho quimérico SCID de prepúcio humano é mostrada na figura 13 e um resumo dos estudos relacionados é apresentado no Quadro 13.

Quadro 13

Resumo de caracterização de modelo <i>in vivo</i> e da inibição de crescimento de vaso humano							
dos tumores M24met no modelo quimérico-SCID							
Parâmetros de Protocolo					Pontos Finais		Notas Gerais
Tumor	Fármaco	Dose	Via	Programa	CD31 (% inibição em comparação com controlo)	Dia do Estudo	

MCF-7	nenhum	na	na	na	não quantificado	19	Tumores implantados intradermicamente. Testados com e sem implante de estradiol e colagénio. Os tumores cresceram lentamente e expressaram boa tinação de CD31 humano
M24met	nenhum	na	na	na	não quantificado	19	Tumores implantados intradermicamente. Testados com e sem matriz de colagénio/FN. Com matriz constatado crescimento de tumor superior, todos os futuros estudos conterão suplementos de matriz. Os tumores mostraram boa tinação de CD31 humano
M24met (pequeno)	nenhum	na	na	na	não quantificado	9	Tamanho do Tumor < 100 mm ³ . Pouco CD31 humano
M24met (médio)	nenhum	na	na	na	não quantificado	12	Tamanho de tumor < 100-200 mm ³ . Algum CD31 humano)

M24met (grande)	nenhum	na	na	na	não quantificado	12	Tamanho tumor < 200 mm ³ . Tumores M24met grandes têm números superiores de fingimento de vaso humano, os estudos futuros serão conduzidos com tumores maiores
M24met	IgG humano não específico	10 mg/kg	IV	2 doses (dia 5 & 9)	0	15	Primeiro estudo de avaliação. 1.12.1 (M29I/D19A) mostrou redução significativa de coloração de CD31 humano. Nenhuma inibição de crescimento de tumor.
	1.12.1 (M29I/D19A)	10 mg/kg	IV		42		
M24met	IgG humano não específico	10 mg/kg	IV	2 doses (dia 5 & 10)	0	14	Segundo estudo de avaliação. Resultados confirmados de GW-366. Nenhuma inibição de crescimento de tumor observada
	1.12.1 (M29I/D19A)	10 mg/kg	IV		40		
M24met	IgG humano não específico	10 mg/kg	SC	2 doses (dia 5 & 10)	0	14	Primeiro teste de actividade dependente da dose de 1.12.1 (M29I/D19A) contra CD31 humano. Algum efeito
	1.12.1 (M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		43		

	1.12.1 (M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		50		dependente da dose observado contra CD31 humano. Algum efeito dependente da dose observado. Resultados PK que dose única será suficiente para redução significativa de CD31. Nenhuma inibição de crescimento de tumor observada.
	1.12.1 (M29I/D19A)	0.1 mg/kg	SC		20		
M24met	Nenhuma dose	0 mg/kg	na	na	ND	16	Segundo teste de dose dependente da actividade de 1.12.1 (M29I/D19A) contra CD31 humano. Dose de depuração dependente do efeito anti-CD31 observada. Nenhuma inibição de crescimento de tumor observada.
	Isotipo igual ou IgG	10 mg/kg	SC	uma dose (dia 5)	0		
	IgG humano não específico	10 mg/kg	SC		ND		
	1.12.1 (M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		24		
	1.12.1 (M29I/D19A)	5 mg/kg	SC		59		
	1.12.1 (M29I/D19A)	10 mg/kg	SC		72		
M24met	Isotipo igual ou IgG	10 mg/kg	SC	uma dose (dia 5)	0	14	Teste de Faixa de Dose ampla final para 1.12.1 (M29I/D19A) Estudo mostrou bons
	1.12.1 (M29I/D19A)	1 mg/kg	SC		33		

1.12.1 (M2 9I/D19A)	3 mg/kg	SC	41	efeitos dependentes da dose. Dados de ajuste a uma dose de curva de resposta de dose sigmoidal produz um CI ₅₀ de 93 nM. Nenhuma inibição de crescimento de tumor observada
1.12.1 (M2 9I/D19A)	5 mg/kg	SC	60	
1.12.1 (M2 9I/D19A)	7,5 mg/kg	SC	60	
1.12.1 (M2 9I/D19A)	10 mg/kg	SC	73	
1.12.1 (M2 9I/D19A)	50 mg/kg	SC	70	

Exemplo 21. Determinação EC₅₀ *In Vivo*

Ratinhos quiméricos SCID de prepúcio humano foram intradermicamente implantados com células M24met e foram tratados (sc) com anticorpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) a 1, 3, 5, 7,5, 10 e 50 mg/kg ou com anticorpo KLH anti-humano de igualação de isotipo (10 mg/kg). Na conclusão das experiências, a área de vaso humano em cada tumor foi quantificada conforme descrito acima. Concentrações de plasma de ratinho de anticorpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) foram medidas usando-se o método descrito a seguir: as amostras de soro dos ratinhos foram analisadas quanto à concentração de anticorpo anti-ALK-1 1.12.1(M29I/D19A) por um ELISA (Ensaio imunoabsorvente ligado por enzima). Placas de ELISA foram revestidas com 10 ng/ml de anticorpo específico IgG Fc anti-humano de cabra (Pierce, N° de Cat 31123) em PBS, incubadas durante a noite a 4 °C e então bloqueadas com tampão de bloqueio StartBlock (Pierce, N° de Cat 37542) em temperatura ambiente por 1 hora. Amostras de soro foram diluídas antes da análise 100 e 1000-vezes em tampão de bloqueio StarBlock. Dois conjuntos de padrões foram preparados no soro em branco diluído 100 e 100-vezes. Os padrões e amostras de soro diluídas foram incubados na placa por 1 h. Anticorpo anti-ALK-1 ligado 1.12.1 (M29I/D19A) foi detectado usando-se IgG de anticorpo anti-

humano de cabra marcado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (específico-Fab) (Sigma, N° de Cat A0293). O substrato usado foi 3, 3', 5, 5'-tetrametil benzidina (Sigma, N° de Cat T8665). A absorvência foi lida a 450 nm numa leitora de placa Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Uma curva padrão foi ajustada utilizando-se regressão não-linear. O limite de detecção deste ensaio foi de 10 ng/ml de anticorpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I/D19A).

Concentração de plasma de ratinho SCID de anticorpo anti-ALK-1 1.12.1 (M29I/D19A) é mostrada na figura 15.

A figura 15 representa a EC_{50} estimada para 1.12.1 (M29I/D19A) no modelo de quimera-SCID de prepúcio M24met. A área de vaso humano foi colocada em gráfico contra PK de plasma médio através do período de estudo (14 dias) para cada grupo de tratamento. Uma curva ajustada foi produzida pelo programa *Sigmoidal Dose Dependent* de Graphpad (Prizm). A EC_{50} de 93 ng/ml (EC_{50} é definida como a concentração de plasma requerida para uma redução de 50% de área de vaso humano do no Grupo de Controlo) foi derivada do ajuste de curva.

Cláusulas preferidas da presente invenção são divulgadas abaixo e são designadas E1 a E24

E1. Um anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio que liga a ALK-1 que compreende um primeiro domínio variável que compreende a SEQ ID NO: 6 e um segundo domínio variável que compreende a SEQ ID NO: 8.

E 2. O anticorpo monoclonal de E 1 que compreende a sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2 e que compreende a sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 4.

E 3. O anticorpo monoclonal de E 1 que compreende a sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 100 e que compreende a sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 102.

E 4. O anticorpo monoclonal de E 1 que compreende uma

cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 6 e uma cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 8.

E 5. O anticorpo monoclonal de E 1 ou 4, o anticorpo monoclonal sendo selecionado a partir de IgG1 ou IgG2.

E 6. Um anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação a antigénio do mesmo que liga a ALK-1 e que tem pelo menos uma propriedade adicional selecionada a partir do grupo consistindo em:

- a) liga-se ao domínio extracelular de ALK-1 de primata com um valor de avidéz de 5 nM ou menos conforme medido pela ressonância de plasmão superficial;
- a) liga-se ao domínio extracelular de ALK-1 de humano com um valor de avidéz de 250 pM ou menos conforme medido pela ressonância de plasmão superficial;
- c) possui um índice de dissociação (k_{off}) para ALK-1 humana de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou menor quando medido pela ressonância de plasmão superficial;
- d) liga-se à ALK-1 de primata com um K_D de 50 nM ou menos, como medido por citometria de fluxo;
- e) possui um K_D (roedor)/ K_D (primata) que é maior que 1,5;
- f) possui um CI_{50} de 150 nM ou menos como medido pela sua capacidade de inibir a regulação positiva de um gene alvo a jusante específico da ALK-1, *Id1*;
- g) possui uma CI_{50} de 250 nM ou menos como medido pela sua capacidade de inibir a fosforilação *Smad1* determinada pelo *Western Blotting*;
- h) inibe a angiogénese dos vasos humanos num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano, em que as células tumorais do melanoma humano M24met são intradermicamente implantadas como determinado pela análise IHC do ensaio de sinal CD-31 humano em pelo menos 40% em comparação com uma amostra de controlo;
- i) inibe a angiogénese dos vasos humanos num ratinho SCID enxertado com tecido do prepúcio humano em que o

colagénio é intradermicamente implantado como determinado pela análise IHC do ensaio de sinal CD-31 humano em pelo menos 50% quando comparado com uma amostra de controlo;

j) concorre para a ligação com a ALK-1 com um anticorpo seleccionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1;

j) inter-concorre para a ligação com a ALK-1 com um anticorpo seleccionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1;

l) liga-se ao mesmo epítipo da ALK-1 como um anticorpo seleccionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A); 1.12.1(M29I); 1.12.1(D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1;

m) liga-se à ALK-1 com substancialmente o mesmo K_D como um anticorpo seleccionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1 (M29I/D19A); 1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.12.1 (rWT) 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; and 5.59.1; e

n) liga-se à ALK-1 com substancialmente o mesmo K_{off} como um anticorpo seleccionado a partir do grupo consistindo em 1.11.1; 1.12.1; 1.12.1(M29I/D19A);

1.12.1 (M29I); 1.12.1 (D19A); 1.12.1 (rWT); 1.13.1; 1.14.1; 1.151.1; 1.162.1; 1.183.1; 1.27.1; 1.29.1; 1.31.1; 1.8.1; 1.9.1; 4.10.1; 4.24.1; 4.38.1; 4.58.1; 4.62.1; 4.68.1; 4.72.1; 5.13.1; 5.34.1; 5.53.1; 5.56.1; 5.57.1; e 5.59.1.

E 7. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com E 6, que compreende um domínio V_H que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104.

E 8. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com E 6, que compreende um domínio V_L que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127.

E 9. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com E 6, em que o domínio V_H é selecionado a partir de qualquer uma das SEQ ID NOS: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOS: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e o domínio V_H é independentemente selecionado a partir de qualquer uma das SEQ ID NOS: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOS: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é

pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

E 10. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com E 6, em que o dito anticorpo ou porção é selecionado a partir do grupo que consiste em:

- (a) um anticorpo ou porção que compreende sequências de V_H CDR1, CDR 2 e CDR3 selecionadas independentemente a partir de CDR1, CDR2, ou CDR3 de cadeia pesada, respetivamente, encontradas em qualquer das SEQ ID NOS: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOS: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída; e
- (b) um anticorpo ou porção que compreende V_L CDR1, CDR2, ou CDR3, respetivamente, encontradas em qualquer das SEQ ID NOS: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOS: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

E 11. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com E 10, em que o anticorpo ou porção são selecionados a partir do grupo que consiste em:

- (a) um anticorpo ou porção que compreende sequências de V_H CDR1, CDR2 e CDR3 encontradas em qualquer uma das SEQ ID NOS: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46;

50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOS: 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30; 34; 38; 42; 46; 50; 54; 58; 62; 66; 70; 74; 78; 82; 86; 90; ou 104 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e

(b) um anticorpo ou porção que compreende V_L CDR1, CDR2 e CDR3 encontradas em qualquer uma das SEQ ID NOS: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127, ou uma sequência que difere de qualquer uma das SEQ ID NOS: 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32; 36; 40; 44; 48; 52; 56; 60; 64; 68; 72; 76; 80; 84; 88; 92; ou 127 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

E 12. O anticorpo ou porção de acordo com E 10 ou 11 selecionados a partir do grupo que consiste em:

- (a) um anticorpo ou porção que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, ou difere da SEQ ID NO: 6 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8, ou difere da SEQ ID NO: 8 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;
- (b) um anticorpo ou porção que compreende um domínio V_H

conforme estabelecido na SEQ ID NO: 10, ou difere da SEQ ID NO: 10 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 12, ou difere da SEQ ID NO: 12 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;

(c) um anticorpo ou porção que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 14, ou difere da SEQ ID NO: 14 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 16, ou difere da SEQ ID NO: 16 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;

(d) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 18, ou difere da SEQ ID NO: 18 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 20, ou difere da SEQ ID NO: 20 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a

pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;

(e) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 22, ou difere da SEQ ID NO: 22 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 24, ou difere da SEQ ID NO: 24 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;

(f) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 26, ou difere da SEQ ID NO: 26 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 28, ou difere da SEQ ID NO: 28 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;

(g) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 30, ou difere da SEQ ID NO: 30 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de

aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 32, ou difere da SEQ ID NO: 32 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;

(h) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 34, ou difere da SEQ ID NO: 34 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 36, ou difere da SEQ ID NO: 36 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída;

(i) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 38, ou difere da SEQ ID NO: 38 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 40, ou difere da SEQ ID NO: 40 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(j) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 42, ou

difere da SEQ ID NO: 42 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 44, ou difere da SEQ ID NO: 44 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(k) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 46, ou difere da SEQ ID NO: 46 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência sequência, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 48, ou difere da SEQ ID NO: 48 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(l) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 50, ou difere da SEQ ID NO: 50 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 52, ou difere da SEQ ID NO: 52 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em

sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(m) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 54, ou difere da SEQ ID NO: 54 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 56, ou difere da SEQ ID NO: 56 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(n) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 58, ou difere da SEQ ID NO: 58 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 60, ou difere da SEQ ID NO: 60 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(o) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 62, ou difere da SEQ ID NO: 62 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 64, ou difere da SEQ ID NO:

18 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(p) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 66, ou difere da SEQ ID NO: 66 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 68, ou difere da SEQ ID NO: 68 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(q) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 70, ou difere da SEQ ID NO: 70 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 72, ou difere da SEQ ID NO: 72 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(r) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 74, ou difere da SEQ ID NO: 74 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com

a pelo menos uma substituição de aminoácido é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 76, ou difere da SEQ ID NO: 76 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

(s) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 78, ou difere da SEQ ID NO: 78 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 80, ou difere da SEQ ID NO: 80 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída; (t) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 82, ou difere da SEQ ID NO: 82 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 84, ou difere da SEQ ID NO: 84 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída; (u) um anticorpo ou porção

do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 86, ou difere da SEQ ID NO: 86 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 88, ou difere da SEQ ID NO: 88 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída; (v) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 90, ou difere da SEQ ID NO: 90 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 92, ou difere da SEQ ID NO: 92 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída; (w) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 104, ou difere da SEQ ID NO: 104 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 127, ou difere da SEQ ID NO: 127 por pelo menos uma substituição de aminoácido

conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída; (x) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, ou difere da SEQ ID NO: 6 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 127, ou difere da SEQ ID NO: 127 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída; e y) um anticorpo ou porção do mesmo que compreende um domínio V_H conforme estabelecido na SEQ ID NO: 104, ou difere da SEQ ID NO: 104 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída, e um domínio V_L conforme estabelecido na SEQ ID NO: 8, ou difere da SEQ ID NO: 8 por pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

E 13. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com E 5, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno compreende uma cadeia pesada que utiliza um gene de V_H humano 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 ou V_H 4-59, ou em que pelo menos uma

substituição de aminoácido conservativa ocorre no gene de V_H humano 4-31, V_H 3-11, V_H 3-15, V_H 3-33, V_H 4-61 ou V_H 4-59, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

E 14. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com E 6, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antigénio compreende uma cadeia leve que utiliza um gene de V_K humano A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 ou V_K L2, ou em que pelo menos uma substituição de aminoácido conservativa ocorre no gene de V_K humano A27, V_K A2, V_K A1, V_K A3, V_K B3, V_K B2, V_K L1 ou V_K L2, em que a dita sequência com a pelo menos uma substituição de aminoácido conservativo é pelo menos 90% idêntica em sequência de aminoácido à sequência não substituída.

E 15. O anticorpo de acordo com qualquer de E 6-14 que é uma molécula de IgG, IgM, IgE, IgA, ou IgD ou é derivado das mesmas.

E 16. Uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende a sequência de nucleótidos conforme estabelecido em qualquer das SEQ ID NOS: 1, 3, 6, 7, 95, 101, 103, 126, 128 ou 129.

E 17. uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende a sequência de nucleótidos conforme estabelecido em qualquer das SEQ ID NOS: 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89 ou 91.

E 18. Um hibridoma depositado sob um número de acesso de ATCC de PTA-6808.

E 19. O anticorpo produzido pelo hibridoma de E 18, ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo.

E 20. Um anticorpo ou porção de ligação a antigénio do

mesmo que liga a ALK-1, o anticorpo ou porção de ligação a antigénio que compreende uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em:

- a) SEQ ID NO: 2;
- b) SEQ ID NO: 4;
- c) SEQ ID NO: 6;
- d) SEQ ID NO: 8;
- e) SEQ ID NO: 100;
- f) SEQ ID NO: 102;
- g) SEQ ID NO: 104;
- h) SEQ ID NO: 127;
- i) a sequência de aminoácidos de V_H codificada pela sequência de nucleótidos do inserto encontrado no clone depositado sob número de acesso de ATCC PTA-6864; e
- j) a sequência de aminoácidos de V_L codificada pela sequência de nucleótidos do inserto encontrado no clone depositado sob número de acesso de ATCC PTA-6865.

E 21. O anticorpo monoclonal ou porção de ligação a antigénio do mesmo de acordo com E 20 que compreende uma sequência de aminoácido de cadeia pesada e uma sequência de aminoácido de cadeia leve selecionadas a partir do grupo consistindo em:

- a) sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2 e a sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 102;
- b) sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 100 e a sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 4; e
- c) e a sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 100 e a sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 102.

E 22. Uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo, ou porção de ligação a antigénio do mesmo de acordo com qualquer de E1-15 ou 19-21 e um transportador fisiologicamente aceitável.

E 23. Um método para inibir a angiogénese num mamífero em necessidade do mesmo, que compreende a etapa de administrar ao dito mamífero numa quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo de acordo com qualquer de E 1-15 ou 19-21 ou a composição farmacêutica de acordo com E 22.

E 24. Um anticorpo monoclonal humano isolado, ou porção de ligação a antígeno do mesmo especificamente se liga a ALK-1 em que o anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácido de CDR1 selecionada a partir do grupo que consiste em:

- a) uma sequência de aminoácidos de CDR1 que compreende a SEQ ID N.º: 136 em que o G em posição um é permutado num D e o S em posição 5 é permutado num N; e
- b) uma sequência de aminoácidos de CDR1 que compreende a SEQ ID N.º: 136 em que o G em posição um é permutado num E e o S em posição 5 é permutado num N.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Pfizer Inc Amgen Fremont Inc.

<120> ANTICORPOS MONOCLONAIIS HUMANOS PARA CINASE-1 TIPO
RECEPTOR DE ACTIVINA

<130> P31976EP-D1-PCT

<140> Ainda não atribuído

<141> 06-09-2009

<150> EP06824915.0

<151> 06-09-2009

<160> 136

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 1332

<212> ADN

<213> Humano

<400> 1

```

cagggtgcagc tgcaggagtc ggggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt ggggtacatct attacagtgg gagtacctac      180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag      300
tcagtggctg gggttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc      360
accaagggcc catcggtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca      420
ggggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac      480
tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc      540
tactccctca gcagcgtagt gaccgtgcc tccagcaact tcggcaccac gacctacacc      600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaattg      660
tgtgtcgagt gccaccctg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc      720
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaacc ctgaggtcac gtgcgtggtg      780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag      840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc      900
agcgtcctca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc      960
tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc     1020
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tccggggagg agatgaccaa gaaccaggtc     1080
agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctcca tgctggactc cgacggctcc     1200
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     1260
tcattctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg     1320
tctccgggta aa                                     1332

```

<210> 2

<211> 444

<212> PRT

<213> Humano

<400> 2

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	20	25	30	
Glu	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	35	40	45	
Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	50	55	60	
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	65	70	75	80
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	85	90	95	
Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Val	Ala	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125	
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	

Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys				
210						215					220								
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe				
225					230					235					240				
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val				
				245					250					255					
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe				
			260					265						270					
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro				
		275					280					285							
Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr				
	290					295					300								
Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val				
305					310					315					320				
Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr				
				325					330					335					
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg				
			340					345						350					
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly				
		355					360					365							
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro				
	370					375					380								
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser				
385					390					395					400				
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln				
				405					410					415					
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His				
			420					425					430						
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
			435					440											

<211> 645

<212> ADN

<213> Humano

<400> 3

```

gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

```

<210> 4

<211> 215

<212> PRT

<213> Humano

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 5

```

caggtgcagc tgcaggagtc ggggtccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggggaat actactggaa ctggatccgc      120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt ggggtacatct attacagtgg gagtacctac      180
tacaacccgt ccctcaagag tgcagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag      300
tcagtggctg gggttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctacg          355
  
```

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 6

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1           5           10           15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20           25           30

Glu Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35           40           45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50           55           60
  
```

<210> 7
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 7

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgta gggccagtc gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc      300
caagggacac gactggagat taaac                                           325

```

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 8

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85           90           95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 9

<211> 361

<212> ADN

<213> Humano

<400> 9

caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtgggccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agtcattgga tgtactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaata atagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcag	300
gagcagtggc ccgatgtttt tgatatctgg ggccaaggga caatgggtcac cgtctcttca	360
g	361

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Humano

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Glu Gln Trp Pro Asp Val Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 322

<212> ADN

<213> Humano

<400> 11

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtc gggcattaga aattatttag cctgggtttca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaagtcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac ttccggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                     322

```

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Humano

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 13

cagggtgcacc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgg 120


```

cagccccccg ggaagggact ggagtggatt gggatatatct attacagtgg gagcaccaac 180
tacaaccctt ccctcaagag tcgaatcacc atatcaatag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgaactctgt gaccgtgcg gacacggcct tgtattactg tgcgagagaa 300
tcagtggccg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

```

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 14

```

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1           5           10           15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20           25           30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35           40           45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50           55           60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65           70           75           80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
85           90           95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 15

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 15

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtattagc agtaggtact tagcctggta ccagcaggaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcaa cactatggta gctcaccgat caccttcggc      300
caaggggacac gactggagat taaac                                           325

```

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 16

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg
20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Pro
85           90           95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100          105

```

<210> 17

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 17

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccgtcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgg      120
cagccccagc ggaagggact ggagtggtatt gggatatatct attacagtgg gagcaccaac      180
tacaaccctt ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa      300
gcagtgtccg cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag          355

```

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 18

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1           5           10           15

```

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ala Val Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 19

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agtacctact tagcctggca ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgtatcca gcagggccag tggcgtccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccgat caccttcggc      300
caagggacac gactggagat taaac                                           325

```

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 20

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	
			20					25					30			
Tyr	Leu	Ala	Trp	His	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
		35					40					45				
Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50					55					60					
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	
65					70					75					80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	
				85					90					95		
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105								

<210> 21

<211> 370

<212> ADN

<213> Humano

<400> 21

caggtgcagc	tcgaggagtc	gggccagga	ctggtgaagc	cttcacagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcagc	agtgggtggc	actactggag	ctggatccgc	120
cagcaccag	ggaagggcct	ggagtggatt	gggtacatct	attacagtgg	gagcacctac	180
tacaaccogt	ccctcaagag	tcgagttacc	atatcagtag	acacgtctaa	gaaccagttc	240
tccctgaagc	tgagttctgt	gactgccgcg	gacacggccg	tatattactg	tgcgagagcg	300
gggcgatttt	tggagtggtc	tgatgttttt	gatatctggg	gccaaaggac	aatggtcacc	360
gtctcctcag						370

<210> 22
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gly Arg Phe Leu Glu Trp Ser Asp Val Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 23

```

gacatcgtga tgaccdagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gagggcdacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct      120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatgatact      300
cctccgacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac      340

```

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Humano

<400> 24

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20           25           30

```

```

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35           40           45

```

```

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60

```

```

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

```

```

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85           90           95

```

```

Tyr Tyr Asp Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100          105          110

```

Lys

<210> 25

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 25

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcacagac cctgtccctc	60
atctgtactg tttctggtgg ctccatcagc agtggggaat actactggag ctggatccgc	120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac	180
tacaaccctg ccctcaagag tcgacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag	300
gggatcgggtg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttcag	355

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 26

235

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Ile Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 27

```

gaaattgtgt tgacgcagtc gccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctctagggt cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcat cagactggac      240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cggtatggta gtcaccgat caccttcggc      300
caagggacac gactggagat taaac                                           325

```

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 28

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ile Arg Leu Asp
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 29

<211> 361

<212> ADN

<213> Humano

<400> 29

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

```

ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg      240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agaggacgat      300
agcagtggct gccctactt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgettectca      360
g                                                                           361

```

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Humano

<400> 30

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
|
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
          20          25          30
|
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
|
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50          55          60
|
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
|
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95
|
Arg Glu Asp Asp Ser Ser Gly Cys Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
|
Gly Thr Leu Val Thr Ala Ser Ser
          115          120

```

<210> 31

<211> 322

<212> ADN

<213> Humano

<400> 31

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaacttag cctggtagca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccagggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagtc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggccattcac ttccggccct      300
gggaccaaag tggatatcaa ac                                             322

```

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Humano

<400> 32

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1              5              10              15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
                20              25              30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Val Leu Ile
    |      35              40              45
    |
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
50              55              60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65              70              75              80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Phe
                85              90              95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
                100              105

```

<210> 33

<211> 370

<212> ADN

<213> Humano

<400> 33

```

cagatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgcagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtc actactggag ctggatccgc      120
cagcaccgcc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcgccctac      180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagcg      300
gggcgatttt tggagtggtc tgatgttttt gatattctggg gccaaaggac aatggtcacc      360
gtctcttttag                                     ,                               370

```

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> Humano

<400> 34

Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ala Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ala Gly Arg Phe Leu Glu Trp Ser Asp Val Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Leu
115 120

<210> 35

<211> 340

<212> ADN

<213> Humano

<400> 35

```

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcca gagggccacc      60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttaact      120
tggtaccagc agaaaccagg acggcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccogg      180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc      240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaata ttataatact      300
cctccgacgt tcggccaagg gaccaagggt gaaatcaagc                               340

```

<210> 36

<211> 113

<212> PRT

<213> Humano

<400> 36

```

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc    60
atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttaact    120
tggtaccagc agaaaccagg acggcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg    180
gaatccgggg tccttgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc    240
atcagcagcc tgcaggetga agatgtggca gtttattact gtcaacaata ttataatact    300
cctccgacgt tcggccaagg gaccaagggt gaaatcaagc    340

```

<210> 37

<211> 379

<212> ADN

<213> Humano

<400> 37

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc    60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct    120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtaatat catatactac    180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaggaa ctactgtat    240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggggaagcc    300
tatgatagta gtggttacta ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc    360
acggtcaccg tctcctcag    379

```

<210> 38

<211> 126

<212> PRT

<213> Humano

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 39

<211> 337

<212> ADN

<213> Humano

<400> 39

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta cttgtattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttc 180
 tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgacaatc 240
 agccgggtgg aggctgacga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtac acaccttctc 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac 337

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Humano

<400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Thr His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41

<211> 376

<212> ADN

<213> Humano

<400> 41

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaagc ctgggggggtc ccttagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaagtgatgg tgggacaaca 180
gactacgctg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300
gggaattact atgatggtag tggttattac tcttttgact actggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctcag 376

```
<210> 42
<211> 125
<212> PRT
<213> Humano
```

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ser Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr	Cys	Thr	Thr	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Phe
			100					105					110		
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120								125

```
<210> 43
<211> 337
<212> ADN
<213> Humano
```

<400> 43

```

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc      60
atctcctgca ggtctagtca gagcctctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg      120
tacctgcaga agccaggga gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggccc      180
tccgggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct      300
cccaatttcg gcggaggga caaggtggag atcaaac                                337

```

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Humano

<400> 44

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

```

```

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20           25           30

```

```

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35           40           45

```

```

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50           55           60

```

```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

```

```

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85           90           95

```

```

Leu Gln Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105          110

```

<210> 45

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 45

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtaatgatt actactggaa ctggatccgc	120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac	180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa	300
tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg	355

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 46

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	
1				5					10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	
			20					25					30			
Asp	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
		35					40					45				
Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	
	50					55					60					
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	
65					70					75					80	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Thr	Asp	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												

<210> 47

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 47

gaaaatgtgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtc	gagtgttagc	agcaactact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcttcca	gcggggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgt	ttactgtcag	cattatggta	gtcaccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	ttaaac				325

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 48

Glu	Asn	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		

Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
		35					40					45			

Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50					55					60				

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65					70					75					80

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
				85					90					95	

Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105			

<210> 49

<211> 361

<212> ADN

<213> Humano

<400> 49

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggag ctggatccgc      120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggtatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac      180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcaatag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa      300
cgtgactacg gtggtggcct tgactactgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcctca      360
g                                                                                   361

```

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Humano

<400> 50

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1                   5                   10                   15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
                20                   25                   30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
                35                   40                   45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50                   55                   60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65                   70                   75                   80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                   90                   95

Cys Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Gly Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                100                   105                   110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115                   120

```

<210> 51

<211> 340
<212> ADN
<213> Humano

<400> 51

gacatcgtga	tgacccagtc	tccagactcc	ctggctgtgt	ctctgggcga	gagggccacc	60
atcaactgca	agtccagcca	gagtgtttta	tacagctcca	tcaataagat	ctacttagct	120
tggtaccagc	agaaaccagg	acagcctcct	aagctgctca	tttactgggc	atctaccgg	180
gaatccgggg	tccctgaccg	attcagtggc	agcgggtctg	ggacagattt	cactctcacc	240
atcagcagcc	tgcaggctga	agatgtggca	gtttattact	gtcaccaata	ttatagtact	300
ccgtggacgt	tcggccaagg	gaccaaggtg	gaaatcaaac			340

<210> 52
<211> 113
<212> PRT
<213> Humano

<400> 52

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	

251

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser
			20					25					30		
Ser	Ile	Asn	Lys	Ile	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			
Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
		50				55					60				
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75				80	
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln
				85					90					95	
Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
			100					105					110		

<210> 53

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 53

cagggtgcagc	tgcaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcacagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcagc	agtgggtgatt	actactggaa	ctggatccgc	120
cagcaccacag	ggaagggcct	ggagtggatt	gggtacatct	attacagtgg	gagcacctac	180
tacaaccctgt	ccctcaagag	tcgagttacc	atttcagtag	ccacgtctaa	gaaccagttc	240
tccctgaagc	tgagctctgt	gactgccgcg	gacacggccg	tgtattactg	tgcgagagag	300
gctacggagg	ggtttgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctcag	355

<210> 54

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Ala Thr Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 55

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 55

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagggccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc accacctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcaactga ttactgtcag cactatggta cctcatcgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaac 325

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 56

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Thr
20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Thr Ser Ser
85           90           95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 57

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 57

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc      120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac      180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa      300
tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg          355

```

<210> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 58

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20          25          30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35          40          45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50          55          60
|
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65          70          75          80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85          90          95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 59

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 59

```

gaaagtgtgt tgacgcagtc tcctggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtttcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgat caccttcggc      300
|
caagggacac gactggagat taaac                                     325

```

<210> 60
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 60

Glu Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 61

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc 120
 cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaacccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
 gatattgcag gattcgaccc ctggggccag ggaacctggt tcaccgtctc ctgag 355

<210> 62

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Asp Ile Ala Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 63

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 63

```

gaatttgtt tgaagcagtc tcaaggcacc ctgtctttgt ctccagggga sagagccacc    60
ctctcttgca gggccagtaa gagtgttagc agcagctact tagctctgga ccagcagaaa    120
cctgggcagg ctccagggt cctcatctac ggtgcatcca ggaaggccac tggcatccca    180
gacaggttca gtggcagtgg gttctgggca gactccctc tcccatcag cagactggag    240
cctgaagatt ttgcagtata ttactgtcag cagtatggta gctcacctat cactctgggc    300
caagggacac gactggagat taaac                                           325

```

<210> 64

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 64

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly | Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85           90           95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100          105

```

<210> 65

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 65

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ettcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgaat actactggag ctggatccgc	120
cagcacccag ggaagggcct ggagtggatt gggatatctt ttacagtgg gagcacctac	180
tacaaccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcactag acacgtctaa gaaccagttc	240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa	300
tccacggacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacg	355

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 66

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Glu Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Ser Thr Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67

<211> 325

<212> ADN

<213> Humano

<400> 67

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcggaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatatat ggtgtatcca gtagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caatatggta gctcaatgat caccttcggc      300
caagggacac gactggagat taaac                                           325

```

<210> 68
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 68

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Met
85           90           95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 69
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 69

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgatt actactggaa ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac      180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag      300
ggcctcgagg cttttgatat ctgggggtcaa gggacaatgg tcaccgactc ttcag          355

```

<210> 70
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 70

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1           5           10           15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20           25           30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35           40           45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50           55           60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65           70           75           80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85           90           95

Cys Ala Arg Glu Gly Leu Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110

Met Val Thr Asp Ser Ser
115

```

<210> 71
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 71

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcattcca gcagggccac tggcatccca      180
gacagggttca gtggcagtgg ctctggggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ctactgtcag cattatggta gctcacttct cactttcggc      300
ggagggacca aggtggagat caaac                                           325

```

<210> 72

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 72

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Leu
          85           90           95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 73

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 73

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggaa ctggatccgc      120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac      180
tacaactcgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag      300
ggccagaacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcag          355

```

<210> 74

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 74

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1           5           10           15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20           25           30

Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35           40           45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser
50           55           60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65           70           75           80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85           90           95

Cys Ala Arg Glu Gly Gln Asn Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 75
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 75

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg	120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taactgggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggtac aactggcct	300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac	340

<210> 76
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 76

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Trp Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 77

<211> 358

<212> ADN

<213> Humano

<400> 77

```

gagggtgcagc tggtaggactc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggggc ccttagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caatttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgcaggct      120

ccagggaagg ggcaggagtg ggttggccgt attaaagca aaactgatgg tgggacaaca      180
gactacgctg caccctgaa aggcagattc acctctcaa gagatgattc aaaaacacg      240
ctgtatctgc aatgaacag cctgaacac gaggaacacg ccgtgtatta ctgtaccaca      300
ggggatggaa cgaactttga ctactgggga cagggaaccc tggtaacccg ctctcag      360

```

<211> 78

<212> PRT

<213> Humano

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Gly Asp Gly Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 79

<211> 322

<212> ADN

<213> Humano

<400> 79


```

gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac      60
atctcctgca aagccagcca agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca      120
ggagaagctg ctattttcat tattcaagaa gctactactc tcgttcctgg aatcccacct      180
cgattcagtg gcagcgggta tggaaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct      240
gaggatgctg catattactt ctgtctacaa catgataatt tcccgetcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                              322

```

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Humano

<400> 80

```

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1          5          10          15

```

```

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
          20          25          30

```

```

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
          35          40          45

```

```

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

```

```

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65          70          75          80

```

```

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu
          85          90          95

```

```

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 81

<211> 379

<212> ADN

<213> Humano

<400> 81

cagggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtac cacatactac	180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa gtcactgtat	240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggg	300
tatagcagtg gctggtagca ggactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc	360
acggtcaccg tctcctcag	379

<210> 82

<211> 126

<212> PRT

<213> Humano

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Glu Asp Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 83

<211> 337

<212> ADN

<213> Humano

<400> 83

```

gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgca agtttagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtttc caaccggttt      180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc      240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct      300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac                                337

```

<210> 84

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 84

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Phe Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20           25           30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

Ser Arg Val Gln Ala Gln Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85           90           95

Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100          105          110

```

<210> 85
 <211> 388
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 85

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggaggggc cctgagactc      60
tctctgtcag cctctggatt caccttcagt gacttctaca tgagctggat ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggaatg gatttcatac attagtagta gtggtagtac catttactac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attattgtgc gagagaagga      300
tactatgatt cggggagtta ttataaggac tacgactact acggtatgga cgtctggggc      360
caagggacca cggtcaccgt ctcttcag                                     388

```

<210> 86
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 86

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Phe
			20					25					30		
Tyr	Met	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Met	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Asp
		100						105					110		
Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser
		115					120					125			

<210> 87
 <211> 337
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 87

```

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca ccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg    120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtctt caaccggctc      180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc     240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct    300
cggacgttcg gcccaaggac caaggtggaa atcaaac                               337

```

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Humano

<400> 88

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20           25           30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35           40           45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85           90           95

Ile Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105          110

```

<210> 89

<211> 379

<212> ADN

<213> Humano

<400> 89

```

caggtgcggc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtatttc catatactac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaaca acgccaagaa ctcaactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaagga      300
tatagcagct cgtcacatta ctacgactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc      360
acggtcaccg tctcctcag                                     379

```

<210> 90

<211> 126

<212> PRT

<213> Humano

<400> 90

```

Gln Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20          25          30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ile Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Ser Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Gly
100          105          110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120          125

```

<210> 91

<211> 337

<212> ADN

<213> Humano

<400> 91

```

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca ccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta ttgtattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag gtccttatct atgaagtttc caaccggttc      180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcagga cagatttcac actgaaaatc      240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtac acagcttcct      300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaac                               337

```

<210> 92

<211> 112

<212> PRT

<213> Humano

<400> 92

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20           25           30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35           40           45

Pro Gln Val Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50           55           60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85           90           95

Thr Gln Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105          110

```


<210> 93

<211> 503

<212> PRT

<213> Macaco Cinomolgo

<400> 93

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Arg Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val
 20 25 30
 Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Arg Gly Pro Thr Cys Gln Gly
 35 40 45
 Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln
 50 55 60
 Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg
 65 70 75 80
 Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn
 85 90 95
 Arg Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Thr Pro Ser Glu Gln
 100 105 110
 Pro Gly Thr Asp Ser Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala
 115 120 125
 Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Val Gly Leu Trp His Val Arg
 130 135 140
 Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp
 165 170 175
 Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
 180 185 190
 Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
 195 200 205
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
 210 215 220
 Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
 225 230 235 240
 Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
 245 250 255
 Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln

260	265	270
Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe		
275	280	285
Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val		
290	295	300
Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr		
305	310	315
Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val		
325	330	335
Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala		
340	345	350
Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro		
355	360	365
Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln		
370	375	380
Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala		
385	390	395
Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly		
405	410	415
Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp		
420	425	430
Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr		
435	440	445
Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu		
450	455	460
Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu		
465	470	475
Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro		
485	490	495
Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln		
500		

<210> 94

<211> 1512

<212> ADN

<213> Macaco Cinomolgo

<400> 94

```

atgaccttgg gctccccgag gagaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgacctag      60
ggtgaccccg tgaagccctc tcggggcccg ctggtgacct gcacatgtga gagcccacat      120
tgcagggggc ctacctgcca gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg      180
aggcaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgaca gggagctctg cagggggcgc      240
cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgt gacagccacc tctgcaaccg caacgtgtcc      300
ctggtgctgg aggccacca aactccttcg gagcagccgg gaacagacag ccagctggcc      360
ctgatcctgg gccccgtgt ggccttgctg gccctggtgg ccctgggtgt cgtgggcctg      420
tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cggggcctgc acagcgagct gggagagtcc      480
agtctcatcc tgaaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt      540
gactgcacca cagggagtgg ctcggggctc cccttcctgg tgcagaggac agtggcacgg      600
caggttgctt tgggtggagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcttg      660
tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggacgaaca gtcttggttc      720
cgggagactg agatctacaa cacagtgttg ctacagacacg acaacatcct aggcttcac      780
gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcattaccac      840
gagcacggct ccctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagccgca tttggctctg      900
aggctagctg tgtccgcagc ctgtggcctg gcacacctgc acgtggagat ctctgggtaca      960
cagggcaaac cggccattgc ccaccgtgac ttcaagagcc gcaacgtgct ggtcaagagc     1020
aacctgcagt gttgcattgc tgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat     1080
tacctggaca tcggcaacaa cccgagagta ggcaccaaga ggtacatggc acccgaggtg     1140
ctggatgagc agatccgcac ggactgcttt gagtcctata agtggactga catctgggcc     1200
tttggcctgg tgctgtggga gatcgcccg cggaccatcg tgaacggcat cgtggaggac     1260
tatagaccac ctttctatga tgtggtgccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag     1320
gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agaccgggtc     1380
ctctcaggcc tagctcagat gatgcgggag tgctggtacc caaacccctc tgcccgactc     1440
actgcgctgc ggatcaagaa gacactacag aaaattagca acagtccaga gaagcccaaa     1500
gtgattcagt ag                                                    1512

```

<210> 95

<211> 1332

<212> ADN

<213> Humano

<400> 95

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccaaggc ctggtgagagc cttcacagac cctgtccctc   60
acctgcacatg tctctgggtgg ctccatgagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc   120
cagcaacccag ggaaggagct ggagtgagat ggggtacatct attacagtgg gagtacctac   180
taccacccctg ccttcagagc tggagttaac atctcagtag acacgtctaa gaaccagttc   240
tccctgaagc tggagctctgt gactgcgcgg gacacggccg tgtattactg tggagagagc   300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaacccctg tcacgtctca ctacgctcc   360
accaaggggc catcgggtctt cccctggcgg cctgtctca ggaagcactc cggagagcaca   420
ggggcccttg gctgctctgt caaggactac ttccccgaac cgttgacggc gtcgtgggac   480
tcagggcttc tgaacagcgg cgtgcacacc ttccagctg tctacagtc ctacggactc   540
tactccctca gacggctggt gacgtgccc tccagcaact tgggaccca gacctaccc   600
tgcaacgtag atcaaacagc cagcaacacc aaggtgggca agacagttga ggcgaatgt   660
tctgttcagc gcccacccctg cccagcacc cctgtggcag gacccctcag cttccctctc   720
cccccaaaa ccaaggacac cctcatgctc tcccggaacc ctgaggtcac gtgctgtgtg   780
gtggacgtga gcccagaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag   840
gtgcataatg ccaagacaca gcccggggag gaggagttca acagcacgtt cgtgtgtgtc   900
agcgtccctc cgtttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtaaca gtcgaaggtc   960
tcccaaaaag gctccacagc ccccatcgag aaaaaccatc ccaaaaacca agggcagccc   1020
cgagaaacc acgtgtacac cctgcccaca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc   1080
agcctgacct gctgtgtcaa aggtttctac cccagcgaca tggcgtgga gtagggagagc   1140
aatgggcagc cggagaaaca ctacaagacc aacactccca tgttggaact cgaaggctcc   1200
ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc   1260
tcatgctcag tcatgcatga ggtctctgac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg   1320
tctccgggta aa                                     1332

```

<210> 96

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> O iniciador direto usado para clonar ECD de ALK-1

<400> 96

acggcccagc cggccgaccc tgtgaagccg tct 33

<210> 97

<211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> O iniciador reverso usado para clonar ECD de ALK-1

<400> 97

actaagcttt taatgatgat gatgatgatg ctggccatct gttcccg 47

<210> 98

<211> 103

<212> PRT

<213> Humano

<400> 98

Asp	Pro	Val	Lys	Pro	Ser	Arg	Gly	Pro	Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Cys	Glu
1			5						10					15	

Ser	Pro	His	Cys	Lys	Gly	Pro	Thr	Cys	Arg	Gly	Ala	Trp	Cys	Thr	Val
			20					25					30		

Val	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	Arg	His	Pro	Gln	Glu	His	Arg	Gly	Cys
		35					40					45			

Gly	Asn	Leu	His	Arg	Glu	Leu	Cys	Arg	Gly	Arg	Pro	Thr	Glu	Phe	Val
50						55					60				

Asn	His	Tyr	Cys	Cys	Asp	Ser	His	Leu	Cys	Asn	His	Asn	Val	Ser	Leu
65					70					75					80

Val	Leu	Glu	Ala	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Gly
				85					90					95	

Gln	His	His	His	His	His	His
						100

<210> 99
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 99

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc agccggccga ccctgtgaag ccgtctcggg gcccgctggt gacctgcacg      120
tgtgagagcc cacattgcaa ggggcctacc tgccgggggg cctgggtgcac agtagtgctg      180
gtgcgggagg aggggaggca ccccaggaa catcggggct gcgggaactt gcacagggag      240
ctctgcaggg ggcgccccac cgagttcgtc aaccactact gctgcgacag ccacctctgc      300
aaccacaacg tgtccctggt gctggaggcc acccaacctc cttcggagca gccgggaaca      360
gatggccagc atcatcatca tcatcat      387

```

<210> 100
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 100

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	20	25	30	
Glu	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	35	40	45	
Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	50	55	60	
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	65	70	75	80
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	85	90	95	
Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Val	Ala	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	115	120	125	
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	130	135	140	
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	145	150	155	160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	165	170	175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	180	185	190	
Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	195	200	205	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	210	215	220	
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	225	230	235	240
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	245	250	255	

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
305					310					315					320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

 $\langle 210 \rangle$ 101

$\langle 211 \rangle$ 645

<212> ADN

<213> Humano

<400> 101

```

gaaattgtgt tgaacagctc tccaggcac cttgtctttgt ctccaggggg aagagacacc 60
ctctcctgtc gggccagtcg gactgtcagc agcagctact tagcctggta ccagccgaaa 120
cctggccagg ctcccaaggc cctcctctat ggtacatcca gcaggccca cggcatccca 180
gacagggttc gtggcagtcg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcggcag cacttcggc 300

caagggcacc gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcgg 360
cactctgatg agcagtcgaa atctgggaact gctctctgtt tgtgactgct gaataacttc 420
taccacagag aggcacaagt acagtgggag gtggataaag ccttcacatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggaacgcagc gacagcactt acagcctcag cagcacctg 540
acgtcgagca aagcagacta cgaagaaacc aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

```

<210> 102

<211> 215

<212> PRT

<213> Humano

<400> 102

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1      5      10      15

Glu Arg Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20      25      30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35      40      45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50      55      60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65      70      75      80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85      90      95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100     105     110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115     120     125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130     135     140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145     150     155     160

Gln Glu Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165     170     175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180     185     190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195     200     205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210     215

```

<210> 103

<211> 355

<212> ADN

<213> Humano

<400> 103

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgca|ctg tctctggtgg ctccatgagc agtggtgaat actactggaa ctggatccgc      120
cagcacc|cag ggaagggcct ggagtggtt ggg|tacatct attacagtgg g|agtacctac      180
tacaacccgt ccctcaagag t|cagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag      300
tcagtggctg gg|tttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag          355

```

<210> 104

<211> 118

<212> PRT

<213> Humano

<400> 104

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Ser Gly
20          25          30

Gln Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35          40          45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50          55          60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65          70          75          80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85          90          95

Cys Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100         105         110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 105

<211> 58

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de Amplificação Usado para clonar 1.12.1 de Comprimento Completo

<400> 105

tcttcaagct tgatatctct agaagccgcc accatgaaac acctgtggtt ctctctcc 58

<210> 106

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de Amplificação Usado para clonar 1.12.1 de Comprimento Completo

<400> 106

ttctctgac agaattccta ctatttaccg ggagacaggg agaggc 46

<210> 107

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de Amplificação usado para clonar 1.12.1 de Comprimento Completo

<400> 107

tcttcaagct tccgggagc cgcaccatg gaaaccccag cgcagctt 48

<210> 108

<211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de Amplificação Usado para clonar 1.12.1 de Comprimento Completo

<400> 108

ttctttgac agaattctca ctaacactct cccctgtga agctctttg 49

<210> 109

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido mutagénico

<400> 109

ctccaggga aagagccacc ctctctgta gg 32

<210> 110

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido mutagénico

<400> 110

cctacaggag aggggtggctc ttccctgg ag 32

<210> 111

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido mutagénico

<400> 111

ggtggctcca tcagcagtg tgaatactac 30

<210> 112

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido mutagénico

<400> 112

gtagtattca ccactgctga tggagccacc 30

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Humano

<400> 113

Glu Ile val Leu Thr Gln ser Pro Gly
1 5

<210> 114

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 114

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
1 5

<210> 115
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador direto

<400> 115

agcgggccca gagggaccat g 21

<210> 116
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador reverso

<400> 116

cagaaaggaa tcaggtgctc ctgggcta 28

<210> 117
 <211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador direto

<400> 117

gattatggcc ttgggtccc ccaggaaa 28

<210> 118

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador indireto

<400> 118

gggctattga atcactttag gcttctctgg actgttg 37

<210> 119

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda TaqMan (ID1-Sonda)

<400> 119

ccagcacgtc atcgactaca tcaggga 27

<210> 120

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR Taqman (ID1-F)

<400> 120

aaggtgagca aggtggagat tc 22

<210> 121

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR Taqman (ID1-R)

<400> 121

ttccgagttc agctccaact g 21

<210> 122

<211> 25

<212> PRT

<213> Humano

<400> 122

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

<210> 123
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 123

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 124
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 124

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 125
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 125

Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 126
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 126

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagacacc      60
ctctcctgta gggccagtca gagtgtcagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcgccgat caccttcggc      300
caaggggacac gactggagat taaac                                           325

```

<210> 127

<211> 108

<212> PRT

<213> Humano

<400> 127

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35           40           45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
          85           90           95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 128

<211> 1332
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 128

```

cagggtgcagc tgcagggagtc ggggtccaggga ctgggtgaagc attcacagaa cctgttcctc    60
acctgcactg tctctgggtg ctccatgagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc    120
cagcaacccag ggaaggggcct ggaagtggatt ggggtacatct attacagtgg gagtacctac    180
taccaaacccgt cctccaagag tggagttaac atatcagtag aacagttctaa gaacaaagtc    240

tccctgaaagc tgagctctgt gactgcgcgc gaaacgggcg tgtattactg tgcagagagag    300
tcagtggtctg ggtttgacta ctgggggcccag ggaacccctg tcacccgtct ctcagcctcc    360
accaaggggcc catcgggtctt cccctctggcg cctctgtctca gtagcaccct cagagagcaca    420
ggcgccctctg gctgcctggc caaggaactac tcccccgaac cgggtgaaggt gtcgtgggac    480
tcaggcgctc tgacaaagcg cgtgcacacc ttcacagctg tctacagtc ctcaggactc    540
tactccctca gcagcgtggt gacccgtgccc tcacagcaact tcggcaacca gacctacacc    600
tgcaacgtag atcacaaagc cagcaacacc aaggtgggca agacagttga gcgcacatgt    660
tgtgttcagc gcccacccctg cccagcacc cctgtggcag gacccgtcagt cttcctcttc    720
cccccaaaa ccaaggacac cctcatgate tcccggaccc ctgaggtcac gtcgctgggtg    780
gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc gagttcaact ggtacgtggg cggcgtggag    840
gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gaggcagttca acagcaagtt ccgtgtggtc    900
agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggaagtaca gtgcaaggtc    960
tccaaacaa gctccccagc ccccatccag aaaaacatct ccaaaaccaa agggcagccc    1020
cgaagacccc aggtgttccc cctgcccacc tcccgggagg agatgaccaa gaacccagtc    1080
agcctgaact gcccggtcac aggcctctac cccagcgaca tggccgtgga gtgggagagc    1140
aatgggcagc cggagaccaa ctaccagacc acacctccca tgcctgactc cgaacggctc    1200
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc    1260
tcattgtccg tgatgcatga ggtctgccc aacacctaca cgcagaagag cctctccctg    1320
tctccgggtc aa                                     1332

```

<210> 129
 <211> 355
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 129

caggtgcagc tgcaggagtc ggggccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagc agtgggtgaat actactggaa ctggatccgc	120
cagcaccacag ggaagggcct ggagtggatt ggggtacatct attacagtgg gagtacctac	180
tacaaccctgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc	240
tccttgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag	300
tcagtggctg ggtttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag	355

<210> 130

<211> 503

<212> PRT

<213> Humano

<400> 130

Met Thr Leu Gly Ser Pro Arg Lys Gly Leu Leu Met Leu Leu Met Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Gln Gly Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly Pro Leu Val
 20 25 30
 Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr Cys Arg Gly
 35 40 45
 Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg His Pro Gln
 50 55 60
 Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys Arg Gly Arg
 65 70 75 80
 Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His Leu Cys Asn
 85 90 95
 His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro Ser Glu Gln
 100 105 110
 Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala
 115 120 125
 Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg
 130 135 140
 Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Thr Met Leu Gly Asp
 165 170 175
 Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe
 180 185 190
 Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val
 195 200 205
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu
 210 215 220
 Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe
 225 230 235 240
 Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile
 245 250 255

Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln
 260 265 270

Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 275 280 285

Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val
 290 295 300

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr
 305 310 315 320

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val
 325 330 335

Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 340 345 350

Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro
 355 360 365

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Gln
 370 375 380

Ile Arg Thr Asp Cys Phe Glu Ser Tyr Lys Trp Thr Asp Ile Trp Ala
 385 390 395 400

Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Ile Ala Arg Arg Thr Ile Val Asn Gly
 405 410 415

Ile Val Glu Asp Tyr Arg Pro Pro Phe Tyr Asp Val Val Pro Asn Asp
 420 425 430

Pro Ser Phe Glu Asp Met Lys Lys Val Val Cys Val Asp Gln Gln Thr
 435 440 445

Pro Thr Ile Pro Asn Arg Leu Ala Ala Asp Pro Val Leu Ser Gly Leu
 450 455 460

Ala Gln Met Met Arg Glu Cys Trp Tyr Pro Asn Pro Ser Ala Arg Leu
 465 470 475 480

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Gln Lys Ile Ser Asn Ser Pro
 485 490 495

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln
 500

<210> 131
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 131

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ile Ala Val Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 132
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 132

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85           90           95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 133

<211> 96

<212> PRT

<213> Humano

<400> 133

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65           70           75           80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85           90           95

```

<210> 134
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 134

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
      20          25          30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35          40          45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50          55          60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65          70          75          80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85          90          95

Cys Ala Arg

```

<210> 135
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 135

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Phe Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 136

<211> 5

<212> PRT

<213> Humano

<400> 136

Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 6316217 B [0002]
- US 6692925 B [0008]
- WO 0348731 A [0117]
- US 5151510 A [0122]
- US 5916771 A [0178]
- US 5939598 A [0178]
- US 5985615 A [0178]
- US 5998209 A [0178]
- US 6075181 A [0178]
- US 6091001 A [0178]
- US 6114598 A [0178]
- US 6130364 A [0178]
- US 5152963 A [0178]
- US 6150584 A [0178]
- WO 9110741 A [0178]
- WO 9402602 A [0178]
- WO 9634096 A [0178]
- WO 9633735 A [0178]
- WO 9816654 A [0178]
- WO 9824893 A [0178] [0180]
- WO 9850433 A [0178]
- WO 9945031 A [0178]
- WO 9953049 A [0178]
- WO 0009560 A [0178] [0234]
- WO 00037504 A [0178]
- US 5994619 A [0179] [0183]

- US 5545807 A [0181]
- US 5545806 A [0181]
- US 5569825 A [0181]
- US 5625126 A [0181]
- US 5633425 A [0181]
- US 5661016 A [0181]
- US 5770429 A [0181]
- US 5789650 A [0181]
- US 6814318 B [0181]
- US 5591669 A [0181]
- US 5612205 A [0181]
- US 5721367 A [0181]
- US 5789215 A [0181]
- US 5643763 A [0181]
- WO 0037504 A [0185]
- US 5168062 A [0217]
- US 4510245 A [0217]
- US 4968615 A [0217]
- US 6517529 B [0217]
- US 4399216 A [0219] [0220]
- US 4634665 A [0219]
- US 5179017 A [0219]
- US 4912040 A [0220]
- US 4740461 A [0220]
- US 4959455 A [0220]
- EP 0216846 A [0222]
- EP 0256055 A [0222]
- EP 0323997 A [0222]
- EP 0338841 A [0222]
- US 5827690 A [0224]
- US 5756687 A [0224]
- US 5750172 A [0224]
- US 574195 A [0224]
- US 6046037 A [0225]
- US 5959177 A [0225]

- US 6417429 B [0226]
- US 5223409 A [0228]
- WO 9218619 A [0228]
- WO 9117271 A [0228]
- WO 9220791 A [0228]
- WO 9215679 A [0228]
- WO 9301288 A [0228]
- WO 9201047 A [0228] [0229]
- WO 9209690 A [0228]
- WO 9306213 A [0229]
- WO 9852916 A [0232]
- WO 0034317 A [0232]
- US 6573293 B [0280]
- US 6534524 B [0282] [0284]
- US 6235764 B [0282]
- WO 9924440 A [0284]
- WO 1999062890 A [0284]
- WO 9521613 A [0284]
- WO 9961422 A [0284]
- US 5834504 A [0284]
- WO 9850356 A [0284]
- US 5883113 A [0284]
- US 5886020 A [0284]
- US 5792783 A [0284]
- US 6653308 B [0284]
- WO 9910349 A [0284]
- WO 9732856 A [0284]
- WO 9722596 A [0284]
- WO 9854093 A [0284]
- WO 9802438 A [0284]
- WO 9916755 A [0284]
- WO 9802437 A [0284] [0311]
- US 6080769 A [0285]
- US 6194438 B [0285]
- US 6258824 B [0285]

- US 6586447 B [0285]
- US 6071935 A [0285]
- US 6495564 B [0285]
- US 6150377 A [0285]
- WO 0140217 A [0286]
- WO 2004020431 A [0286]
- US 5608082 A [0287]
- US 20050148627 A [0288]
- US 20050148777 A [0288]
- US 5466823 A [0289]
- US 5633272 A [0290]
- US 5932598 A [0291]
- US 5521207 A [0292]
- US 6034256 A [0293]
- WO 200224719 A [0294]
- WO 199803484 A [0297]
- WO 199911605 A [0299]
- US 8180651 B [0301]
- WO 9802434 A [0311]
- WO 9935146 A [0311]
- WO 9935132 A [0311]
- WO 9713760 A [0311]
- WO 9519970 A [0311]
- US 5587458 A [0311]
- US 5877305 A [0311]
- US 6465449 B [0311]
- US 6284764 B [0311]
- WO 200198277 A [0311]
- EP 239362 A [0324]
- US 6682736 B [0336]
- US 60113647 B [0336]
- WO 2002053596 A [0337]
- WO 2003040170 A [0338]
- US 5679666 A [0345]
- US 5770592 A [0345]

- EP 06824915 A [0437]

Documentos de não patente citados na descrição

- **ATTLSANO et al.** *Cell*, 1993, vol. 75, 671-680 [0002]
- **TEN DIJKE et al.** *Oncogene*, 1993, vol. 8, 2879-2887 [0002]
- **ATTISANO et al.** *Cell*, 1993, vol. 75, 671-680 [0002]
- **HELDIN et al.** *Nature*, 1997, vol. 390, 465-471 [0003]
- **ABDALLA et al.** *J. Med. Genet.*, 2003, vol. 40, 494-502 [0004]
- **SADICK et al.** *Hematologica/The Hematology J.*, 2005, vol. 90, 818-828 [0004]
- **OH et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, 2626-2631 [0004]
- **URNESSE et al.** *Nature Genetics*, 2000, vol. 26, 328-331 [0004]
- **HANAHAN ; FOLKMAN.** Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis. *Cell*, 1996, vol. 86 (3), 353-364 [0005]
- **CARMELET.** Angiogenesis in Health and Disease. *Nature Medicine*, 2003, vol. 9 (6), 653-660 [0005]
- **BERGERS; BENJAMIN.** Tumoreigenesis and the Angiogenic Switch. *Nature Reviews*, 2003, vol. 3, 401-410 [0005]
- **BONNET et al.** Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation. *Rheumatology*, 2005, vol. 44, 7-16 [0006]
- **CREAMER et al.** Angiogenesis in psoriasis. *Angiogenesis*, 2002, vol. 5, 231-236 [0006]
- **CLAVEL et al.** Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2003, vol. 70, 321-326 [0006]
- **ANANDARAJAH et al.** Pathogenesis of psoriatic arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2004, vol. 16, 338-343 [0006]
- **NG et al.** Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular

degeneration. *Can. J. Ophthalmol.*, 2005, vol. 40, 352-368 [0006]

- **WITMER et al.** Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal & Eye Research*, 2003, vol. 22, 1-29 [0006]

- **ADAMIS et al.** Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis*, 1999, vol. 3, 9-14 [0006]

- **LUX et al.** *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 9984-9992 [0008]

- **ABDALLA.** *Human Mol. Gen*, 2000, vol. 9, 1227-1237 [0008]

- **FEMANDEZ-L et al.** Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovascular Research*, 05 July 2005, vol. 68 (2), 235-248 [0010]

- **SAMBROOK J. ; RUSSELL D.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 [0069]

- **AUSUBEL et al.** *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, John & Sons, Inc, 2002 [0069]

- **HARLOW ; LANE.** *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998 [0069]

- **COLIGAN et al.** *Short Protocols in Protein Science*. Wiley, John & Sons, Inc, 2003 [0069]

- **VOLPERT, OLGA V. et al.** Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin- 1. *Cancer Cell*, December 2002, vol. 2, 473-483 [0075]

- *Immunology-A Synthesis*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, 1991 [0082]

- **PEARSON.** *Methods Mol. Biol.*, 1994, vol. 243, 307-31 [0083]

- **GONNET et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 1443-45 [0085]

- *Prafeins, Structures and Molecular Principles*. W. H.

Freeman and Company, 1984 [0087]

- Introduction to Protein Structure. Garland Publishing, 1991 [0087]
- **THOMTON et al.** *Nature*, 1991, vol. 354, 105 [0087]
- **PEARSON.** *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 183, 63-98 [0088] [0128]
- **PEARSON.** *Methods Mol. Biol.*, 2000, vol. 132, 185-219 [0088]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0088]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-402 [0088]
- **FAUCHERE.** *J. Adv. Drug Res.*, 1986, vol. 15, 29 [0090]
- **VEBER ; FREIDINGER.** *TINS*, 1985, 392 [0090]
- **EVANS et al.** *J. Med. Chem.*, 1987, vol. 30, 1229 [0090]
- **RIZO; GIERASCH.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 387 [0092]
- Fundamental Immunology. Raven Press, 1989 [0093]
- **KABAT.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, 1987 [0094]
- **CHOTHIA ; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0094]
- **CHOTHIA et al.** *Nature*, 1989, vol. 342, 878-883 [0094]
- **WARD et al.** *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0104]
- **BIRD et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0104] [0237]
- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0104]
- **HOLLIGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0104]
- **POLJAK et al.** *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123 [0104]
- **KIPRIYANOV et al.** *Human Antibodies and Hybridomas*, 1995, vol. 6, 93-101 [0105]
- **KIPRIYANOV et al.** *Mol. Immunol.*, 1994, vol. 31, 1047-

1058 [0105]

- VAUGHAN, T.J. et al. *Nature Biotech*, 1996, vol. 14, 309-314 [0111]
- JONSSON et al. *Ann. Biol. Clin.*, 1993, vol. 51, 19-26 [0112]
- JONSSON et al. *Biotechniques*, 1991, vol. 11, 620-627 [0112]
- JONSSON et al. *J. Mol. Recognit.*, 1995, vol. 8, 125-131 [0112]
- JOHNSON et al. *Anal. Biochem.*, 1991, vol. 198, 268-277 [0112]
- LAPLANCHE et al. *Nucl. Acids Res*, 1986, vol. 14, 9081 [0122]
- STEC et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, vol. 106, 6077 [0122]
- STEIN et al. *Nucl. Acids Res*, 1988, vol. 16, 3209 [0122]
- ZON et al. *Anti-Cancer Drug Design*, 1991, vol. 6, 539 [0122]
- ZON et al. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*. Oxford University Press, 1991, 87-108 [0122]
- UHLMANN ; PEYMAN. *Chemical Reviews*, 1990, vol. 90, 543 [0122]
- PEARSON. *Methods Mol. Biol*, 2000, vol. 132, 185-219 [0128]
- PEARSON. *Methods Enzymol*, 1996, vol. 266, 227-258 [0128]
- PEARSON. *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 276, 71-84 [0128]
- Antibody Engineering. Springer-Verlag, 2001 [0163]
- GREEN et al. *Nature Genetics*, 1994, vol. 7, 13-21 [0178]
- MENDEZ et al. *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, 146-156 [0180]
- GREEN ; JAKOBOVITS. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 483-495 [0180]

- **HARLOW ; LANE.** Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1990 [0183]
- **BABCOOK, J.S. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 7843-48 [0190]
- **GRIFFITHS et al.** *EMBO J.*, 1994, vol. 13, 3245-3260 [0192]
- **NISSIM et al.** *EMBO J.*, 692-698 [0192]
- **GRIFFITHS et al.** *EMBO J.*, vol. 12, 725-734 [0192]
- **SAMBROOK J. ; RUSSELL D..** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 [0209]
- **KABAT et al.** Sequences of Protein of Immunological Interest. NIH Publ. No. 91-3242, 1991 [0211]
- **HOGAN et al.** Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1999 [0226]
- **JACKSON et al.** Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach. Oxford University Press, 2000 [0226]
- **PINKERT.** Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook. Academic Press, 1999 [0226]
- **FUCHS et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1370-1372 [0228]
- **HAY et al.** *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1992, vol. 3, 81-85 [0228]
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0228]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0228] [0229] [0237]
- **GRIFFITHS et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0228] [0229]
- **HAWKINS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0228]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0228]
- **GRAM et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3576-3580 [0228]
- **GARRAD et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1373-1377 [0228]

- **HOOGENBOOM et al.** *Nuc. Acid Res.*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0228]
- **BARBAS et al.** *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 79T8-7982 [0228]
- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0237]
- **III et al.** *Protein Eng.*, 1997, vol. 10, 949-57 [0238]
- **MARTIN et al.** *EMBO J*, 1994, vol. 13, 5303-9 [0238]
- **HOLLIGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0238]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0238]
- **TRAUNECKER et al.** *Int. J. Cancer*, 1992, vol. 7, 51-52 [0238]
- **SONGSIVILAL ; LACHMANN.** *Clin. Exp. Immunol*, 1990, vol. 79, 315-321 [0239]
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0239]
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, Inc, 1978 [0250]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Williams & Wilkins, 1995 [0358]
- **TOMLINSON et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 227, 776-798 [0395]
- *Hum. Mol. Genet.*, 1994, vol. 3, 853-860 [0395]
- *EMBO J.*, 1995, vol. 14, 4628-4638 [0395]
- **H-C YAN et al.** Human/Severe Combined Immunodeficient Mouse Chimeras, An Experimental In Vivo Model System to Study the Regulation of Human Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecules. *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 91, 986 [0426]
- **J. VARNER.** Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin. *Amer. J. Path.*, 2000, vol. 156 (4), 1345 [0426]

- **K. TAHTIS et al.** Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model. *Mol. Cancer. Ther.*, 2003, vol. 2 (8), 729 **[0426]**
- **TAHTIS et al.** Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model. *Mol. Cancer. Ther.*, 2003, vol. 2 (8), 729 **[0426]**
- **MUELLER.** Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells. *Cancer Research*, 1995, vol. 55 (8), 1629-32 **[0428]**

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo de neutralização monoclonal anti-ALK-1, ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno do mesmo competem cruzadamente para a ligação com a ALK-1 com um anticorpo que compreende:

- a. um domínio variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 6 e um domínio variável de cadeia leve da SEQ ID N.º: 8; ou
- b. a sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada codificada pela sequência nucleotídica do inserto encontrado no clone depositado sob o número de acesso ATCC PTA-6864 e a sequência de aminoácidos de domínio variável de cadeia leve codificada pela sequência nucleotídica do inserto encontrado no clone depositado sob o número de acesso ATCC PTA-6865.

2. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 1, em que o dito anticorpo compreende:

- a. uma cadeia pesada que utiliza uma sequência de linha germinal V_H 4-31 humana; e
- b. uma cadeia leve que utiliza uma sequência de linha germinal V_K A27 humana.

3. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 2, em que a sequência de aminoácidos da dita cadeia pesada é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência de linha germinal V_H 4-31 humana, e em que a sequência de aminoácidos da dita cadeia leve é pelo menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos codificada pela sequência de linha germinal V_K A27 humana.

4. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o dito

anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6.

5. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_L que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

6. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 e um domínio V_L que é pelo menos 90% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

7. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 95% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 e um domínio V_L que é pelo menos 95% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

8. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, em que o dito anticorpo compreende um domínio V_H que é pelo menos 99% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 e um domínio V_L que é pelo menos 99% idêntico ao da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

9. O anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que o dito anticorpo é uma molécula de IgG, ou é derivado da mesma.

10. O anticorpo de acordo com a reivindicação 9, em que o dito anticorpo é uma molécula de IgG1 ou IgG2.

11. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno é derivado ou ligado a outra molécula.

12. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com a reivindicação 11, em que a dita molécula é outro anticorpo, um agente de detecção, um marcador, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, um péptido ou uma proteína.

13. Uma molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12; ou uma molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12.

14. Um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que cada vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico; ou um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou

porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que o vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico.

15. Uma célula hospedeira que compreende

- a. uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12;
- b. uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12;
- c. um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12. em que cada vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico; ou
- d. um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que o vetor compreende uma sequência de controlo de expressão ligada operativamente à molécula de ácido nucleico.

16. Uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, e um transportador fisiologicamente aceitável.

17. Utilização do anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 ou a composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16 para o fabrico de um medicamento.

18. Um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 ou uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16, para utilização em terapêutica.

19. Utilização do anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 ou a composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro, degeneração macular relacionada com a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide num mamífero.

20. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12 ou a composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 16 para utilização no tratamento de cancro, degeneração macular relacionada com a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide num mamífero.

21. Utilização de:

- a. uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico que compreende uma

sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, ou

b. uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12;

para o fabrico de um medicamento.

22. Uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, ou uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12; para utilização em terapêutica.

23. Utilização de:

a. uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, ou

b. uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve do anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12;

para o fabrico de um medicamento para o tratamento de

cancro, degeneração macular relacionada com a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide num mamífero.

24. Uma molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia pesada, e uma molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia leve, de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, ou uma molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12;

para utilização no tratamento de cancro, degeneração macular relacionada com a idade, cegueira diabética, endometriose, neovascularização ocular, psoríase ou artrite reumatoide num mamífero.

25. O anticorpo, porção de ligação a antigénio ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 20 para utilização no tratamento de cancro, ou a utilização de acordo com a reivindicação 19 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro, em que o cancro é melanoma cutâneo ou intraocular, mesotelioma, carcinoma de células renais, cancro da mama, cancro da cabeça e pescoço, um tumor cerebral primário ou secundário, carcinoma do colo do útero, cancro da uretra, cancro da próstata, cancro pancreático, cancro testicular, cancro hepatobiliar, cancro dos canais hepáticos, cancro dos canais biliares, cancro colorretal, cancro da bexiga, cancro ovárico, cancro de pulmão, cancro de pulmão de células não pequenas, cancro de pulmão de células pequenas, cancro do cólon, cancro retal, ou cancro da região anal.

26. Utilização de um anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 4 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro hepatobiliar num mamífero.

27. Um anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2 e uma sequência de aminoácidos de cadeia leve da SEQ ID NO: 4 para utilização no tratamento de cancro hepatobiliar num mamífero.

28. O anticorpo, porção de ligação a antigénio ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 20, 25 e 27,

a molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia pesada, e a molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica que codifica a cadeia leve, de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, ou a molécula isolada de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve de um anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, para utilização de acordo com a reivindicação 24, ou

a utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 19, 23, 25, e 26;

em que o mamífero é um ser humano.

FIG. 1

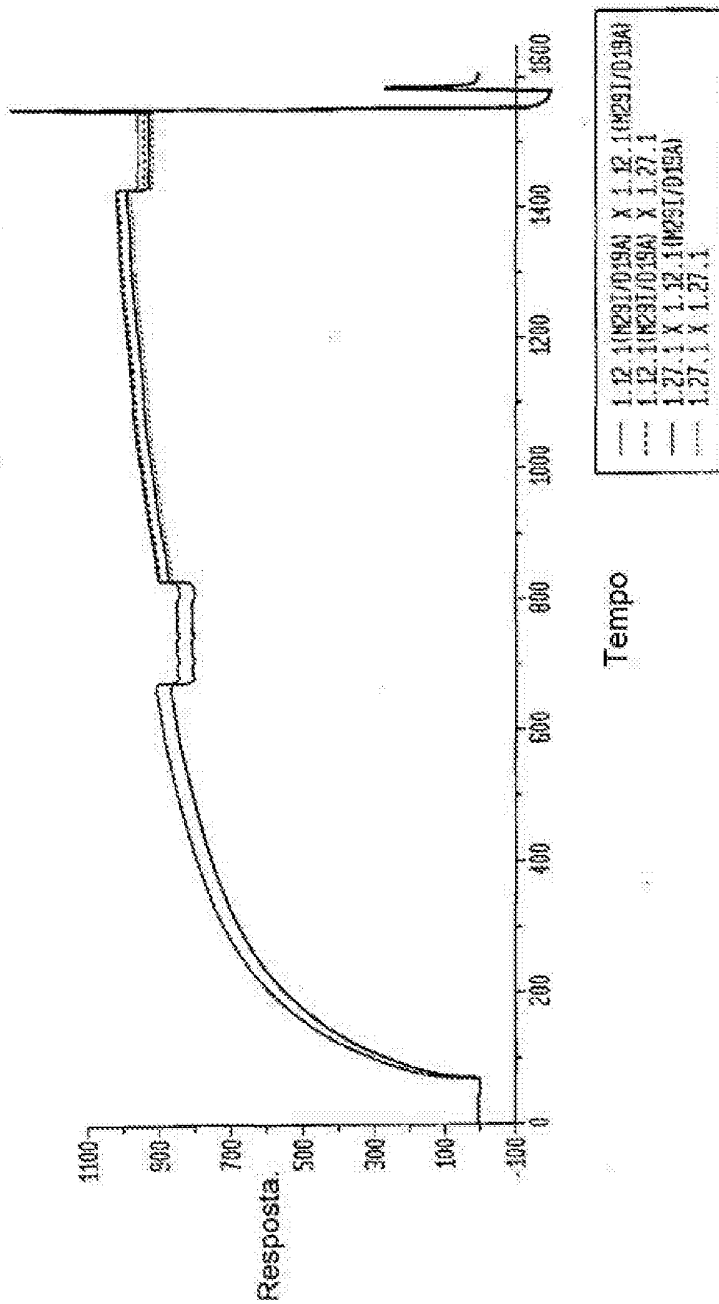


FIG. 2

Humano	MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEG	60
Cino	MTLGSPRRGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCRGPTCQGAWCTVVLVREEG	60
	*****:*****;****:*****	
Humano	RHPQEHRCGNLHRELCRGRPTFVNHYCCDSHLCNHNVSLEATQPPSEQPGTDGQLA	120
Cino	RHPQEHRCGNLHRELCRGRPTFVNHYCCDSHLCNRNVSLEATQTPSEQPGTDSQLA	120
	*****:*****;*****,**	
Humano	LILGPVLALLALVALGVGLWHVRRRQEKQRLHSELGESSLILKASEQGDMLGDLLDS	180
Cino	LILGPVLALLALVALGVVGLWHVRRRQEKQRLHSELGESSLILKASEQGDMLGDLLDS	180
	*****:*****:*****	
Humano	DCTTGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF	240
Cino	DCTTGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF	240

Humano	RETEIYNTVLLRHDNILGFASDMTSRNSSTQLWLITHYEHGSLYDFLQRQTLEPHAL	300
Cino	RETEIYNTVLLRHDNILGFASDMTSRNSSTQLWLITHYEHGSLYDFLQRQTLEPHAL	300

Humano	RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIADLGLAVMHSQGS	360
Cino	RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIADLGLAVMHSQGS	360

Humano	YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCEFSYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED	420
Cino	YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCEFSYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED	420

Humano	YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMRECWPNP SARL	480
Cino	YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMRECWPNP SARL	480

Humano	TALRIKKTLOKISNSPEKPKVIO	503 (SEQ. ID NO.:130)
Cino	TALRIKKTLOKISNSPEKPKVIO	503 (SEQ. ID NO.:93)

FIG. 3A

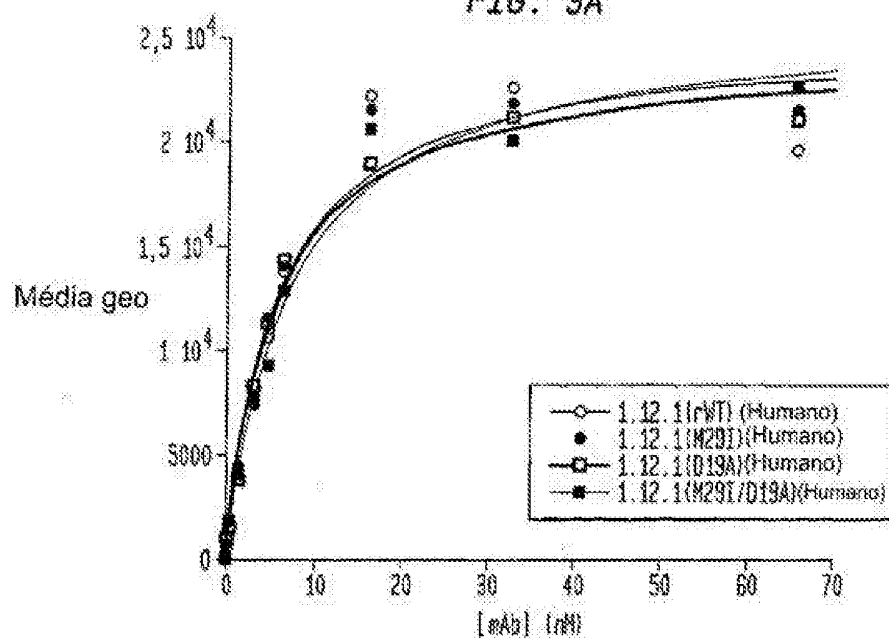


FIG. 3B

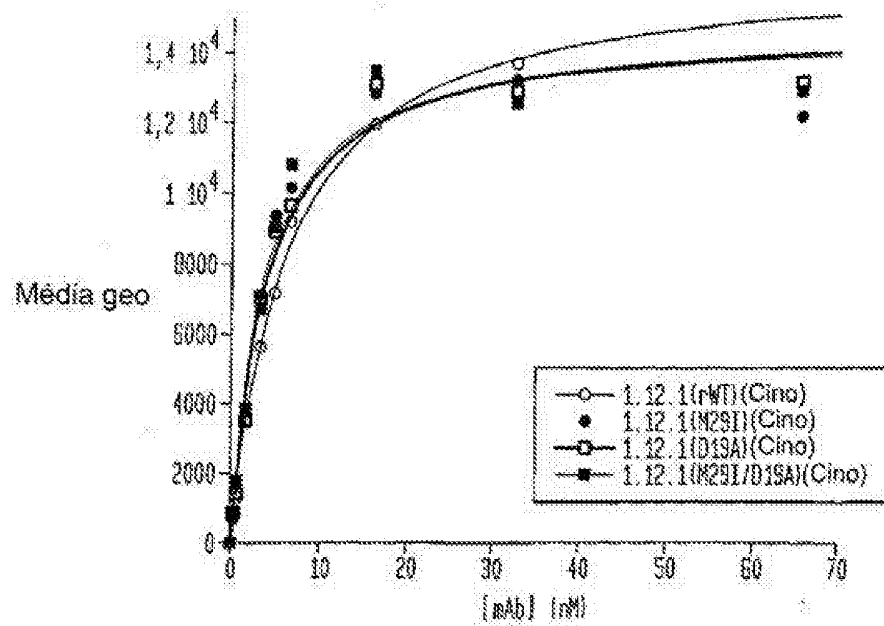
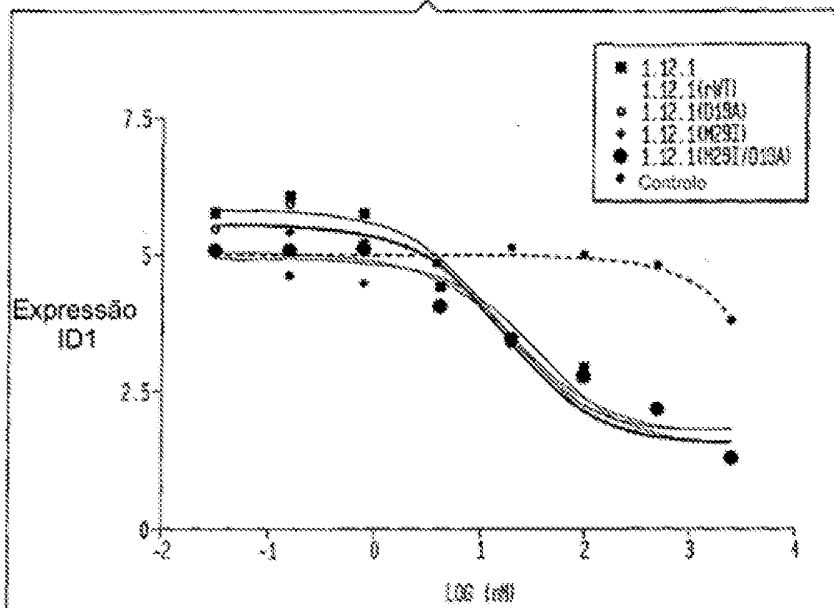
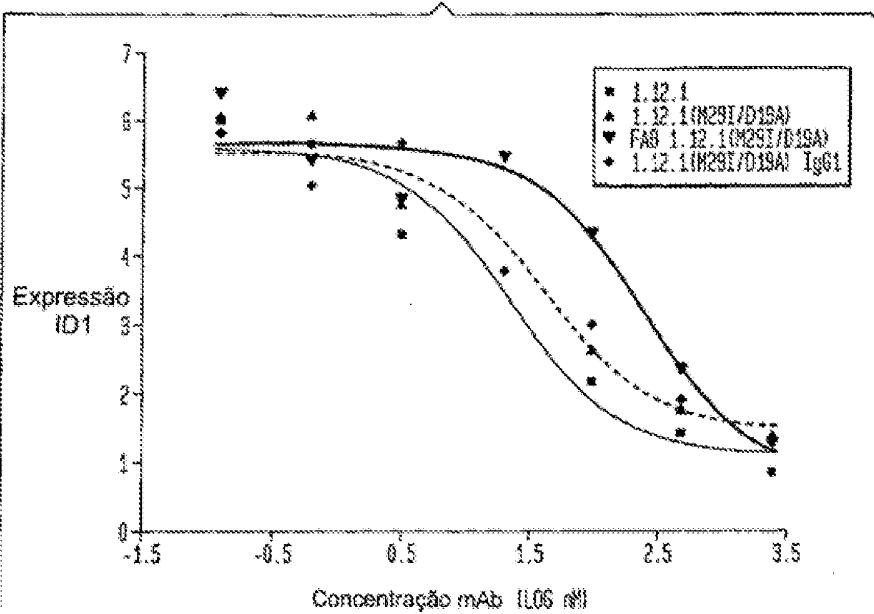


FIG. 4



Dose sigmoidal-resposta	1.12.1	1.12.1(rWT)	1.12.1(D19A)	1.12.1(M29I)	1.12.1(M29I/D19A)	Controle
IC50, nM	13,55	8,1	17,66	34,65	22,15	1,16E+09
IC50 Erro	1,81	1,91	1,35	1,62	1,87	NA
R²	0,9555	0,922	0,9521	0,9544	0,9488	0,9468

FIG. 5



Dose sigmoidal-resposta	1.12.1	1.12.1(M29T/D19A)	FAB 1.12.1(M29T/D19A)	1.12.1(M29T/D19A) IgG1
IC50, nM	22,61	17,62	254,30	46,95
IC50 Erro	1,62	1,48	1,63	1,65
R²	0,94	0,97	0,94	0,94

FIG. 6A

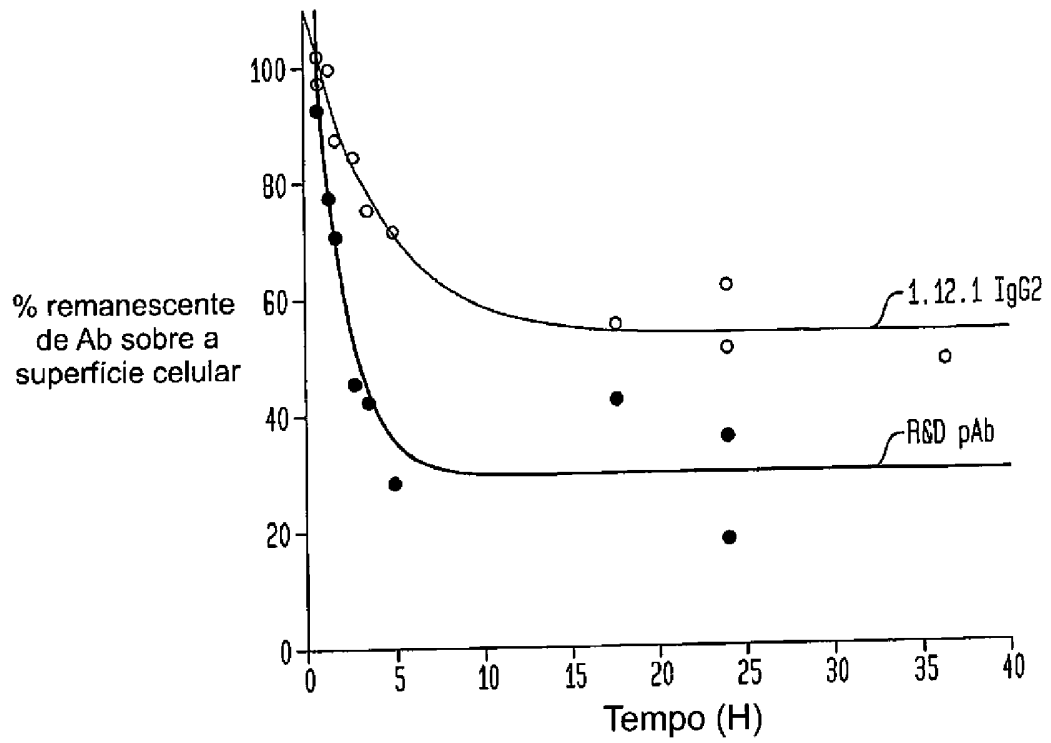


FIG. 6B

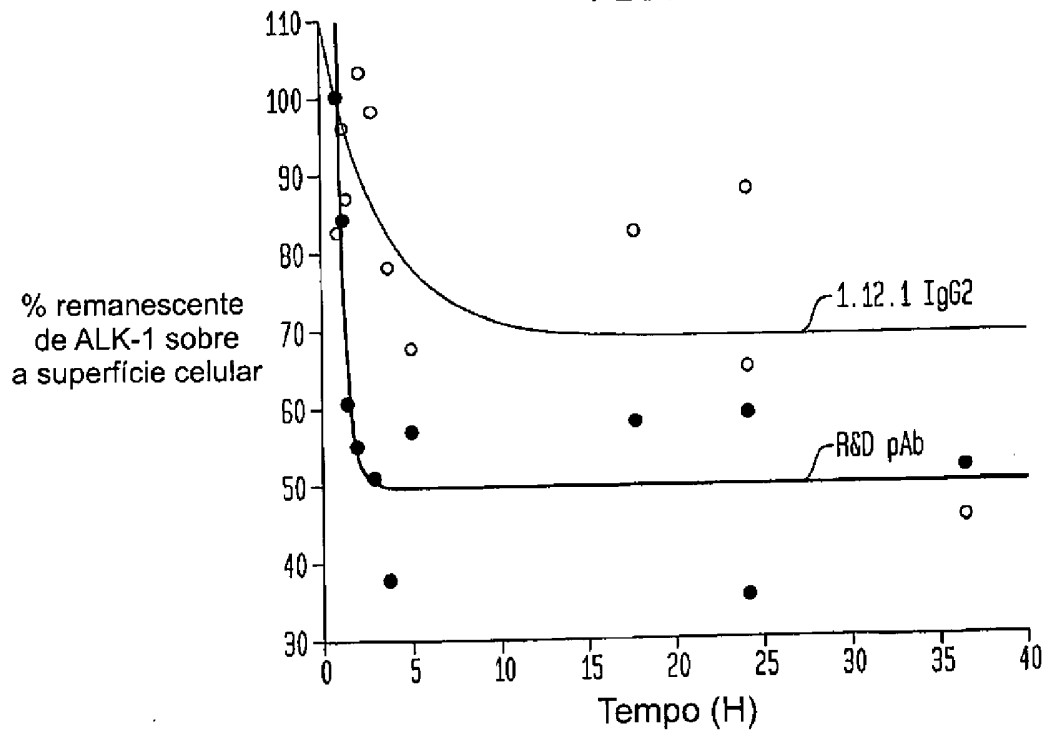


FIG. 7A**1.12.1 VH**

Expresso: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSMSSGEYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTY 60
 (SEQ ID NO: 104)
 Linha germinal: 1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSTY 60
 (SEQ ID NO: 131)

Expresso: 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE-SVAG-FDYWGQGLTVTVSS 118
 Linha germinal: 61 YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAGYFDYWGQGLTVTVSS 120

1.12.1 VL

Expresso: 1 EIVLTQSPGTLSLSPGERDTLSCHASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGTSRATGIP 60
 (SEQ ID NO: 127)
 Linha germinal: 1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCHASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIP 60
 (SEQ ID NO: 132)

Expresso: 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTREIK 108
 Linha germinal: 61 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTREIK 108

FIG. 7B

	10	20	30	
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERD	TLSCRASQSVS	1.12.1 VL (SEQ ID 127)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	TLSCRASQSVS	1.14.1 VL (SEQ ID 20)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	TLSCRASQSVS	1.162.1 VL (SEQ ID 28)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	TLSCRASQSVS	1.31.1 VL (SEQ ID 135)
1	ESVLTQSPGTL	SLSPGERATL	TLSCRASQSVS	4.62.1 VL (SEQ ID 60)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	TLSCRASQSVS	4.72.1 VL (SEQ ID 68)
1	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	TLSCRASQSVS	Linha (A27) (SEQ ID NO:133)
				germinal

	40	50	60	
31	SSYLAWYQQKPGQAPRL	LIYGTS	SSRATGIP	1.12.1 VL
31	STYLAWHQKPGQAPRL	LIYGVSSRA	SGVP	1.14.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRL	LIYGASSRATGIP		1.162.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRL	LIYGASSRATGIP		1.31.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRL	LIYGVSSRATGIP		4.62.1 VL
31	SSYLAWYQQRKPGQAPRL	LIYGVSSRATGIP		4.72.1 VL
31	SSYLAWYQQKPGQAPRL	LIYGASSRATGIP		Linha (A27)
				germinal

	70	80	90	
61	DRFSGSGSGTDFTLT	ISRLEPEDFAVYYCQ		1.12.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLT	ISRLEPEDFAVYYCQ		1.14.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLT	ISRLEPEDFAVYYCQ		1.162.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLT	ISRLEPEDFAVYYCQ		1.31.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLT	ISRLEPEDFAVYYCQ		4.62.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLT	ISRLEPEDFAVYYCQ		4.72.1 VL
61	DRFSGSGSGTDFTLT	ISRLEPEDFAVYYCQ		Linha (A27)
				germinal

	100	
91	QYGSSPITFGQGTRLEIK	1.12.1 VL
91	QYGSSPITFGQGTRLEIK	1.14.1 VL
91	RYGSSPITFGQGTRLEIK	1.162.1 VL
91	HFGSSPITFGQGTRLEIK	1.31.1 VL
91	QYGSSPITFGQGTRLEIK	4.62.1 VL
91	QYGSSMITFGQGTRLEIK	4.72.1 VL
91	QYGSSP	Linha (A27)
		germinal

FIG. 7C

		10	20	30	
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SM	1.12.1 VH (SEQ ID 104)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	1.151.1 VH (SEQ ID 22)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	1.162.1 VH (SEQ ID 26)
1	QMQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	1.8.1 VH (SEQ ID 34)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	4.24.1 VH (SEQ ID 46)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	4.38.1 VH (SEQ ID 50)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	4.58.1 VH (SEQ ID 54)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	4.62.1 VH (SEQ ID 58)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	4.68.1 VH (SEQ ID 62)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	4.72.1 VH (SEQ ID 66)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	5.13.1 VH (SEQ ID 70)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	5.34.1 VH (SEQ ID 74)
1	QVQLQESGPG	LVKPSQTLS	LTCTVSGG	SI	4-31 Linha (SEQ ID NO: 134)
					germinal
		40	50	60	
31	SGEYYW	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	1.12.1 VH
31	SGGHYWS	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	1.151.1 VH
31	SGEYYWS	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	1.162.1 VH
31	SGGHYWS	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSAY	1.8.1 VH
31	SNDYYW	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	4.24.1 VH
31	SGDYYWS	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	4.38.1 VH
31	SGDYYW	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	4.58.1 VH
31	SGDYYW	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	4.62.1 VH
31	SGDYYW	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	4.68.1 VH
31	SGEYYWS	NIHQHPGK	GLEWIGYI	FYSGSTY	4.72.1 VH
31	SGDYYW	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	5.13.1 VH
31	SGDYYW	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	5.34.1 VH
31	SGGYWS	NIHQHPGK	GLEWIGYI	YYSGSTY	4-31 Linha germinal

FIG. 7D

		70	80	90	
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				1.12.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				1.151.1 VH
61	Y N P S L K S R L T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				1.162.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				1.8.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				4.24.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S I D T S K N Q F S L K L S S V T A A				4.38.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V A T S K N Q F S L K L S S V T A A				4.58.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				4.62.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				4.68.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S L D T S K N Q F S L K L S S V T A A				4.72.1 VH
61	Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				5.13.1 VH
61	Y N S S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A				5.34.1 VH
61	<u>Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A</u>				4-31 Linha germinal

91	D T A V Y Y C A R	1.12.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	1.151.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	1.162.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	1.8.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.24.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.38.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.58.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.62.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.68.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4.72.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	5.13.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	5.34.1 VH
91	D T A V Y Y C A R	4-31 Linha germinal

FIG. 8

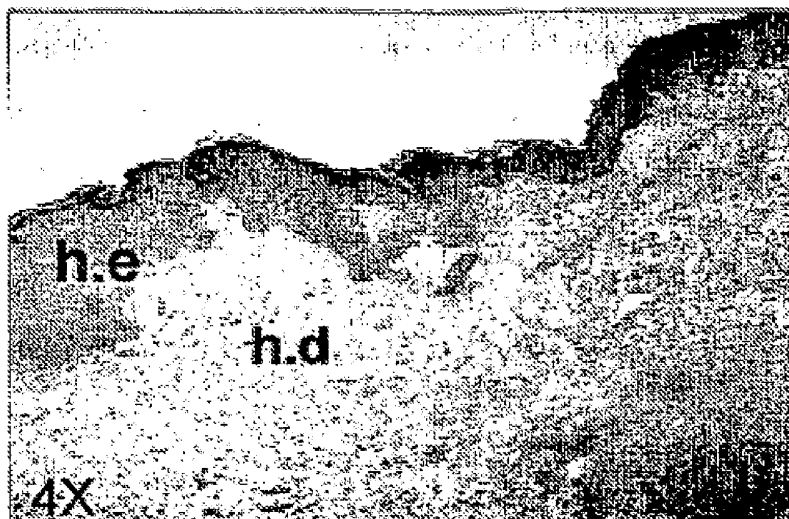


FIG. 9A

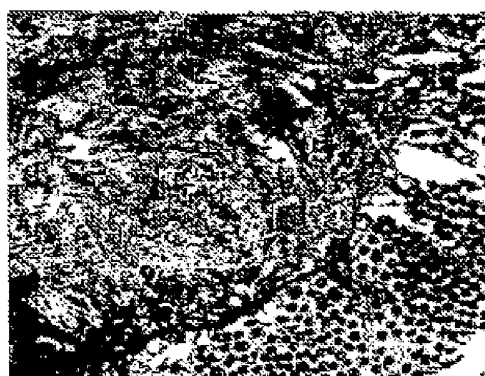


FIG. 9B

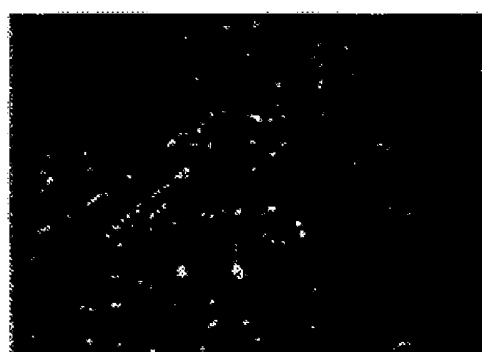


FIG. 10

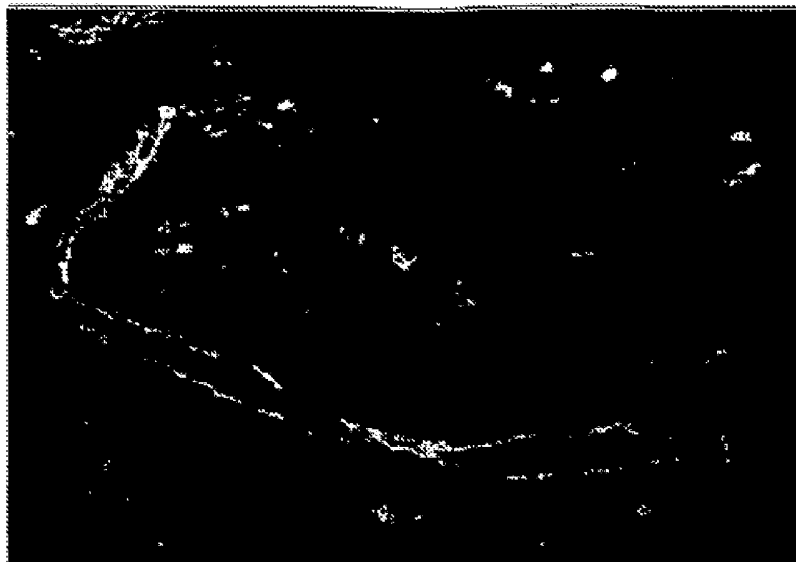


FIG. 11

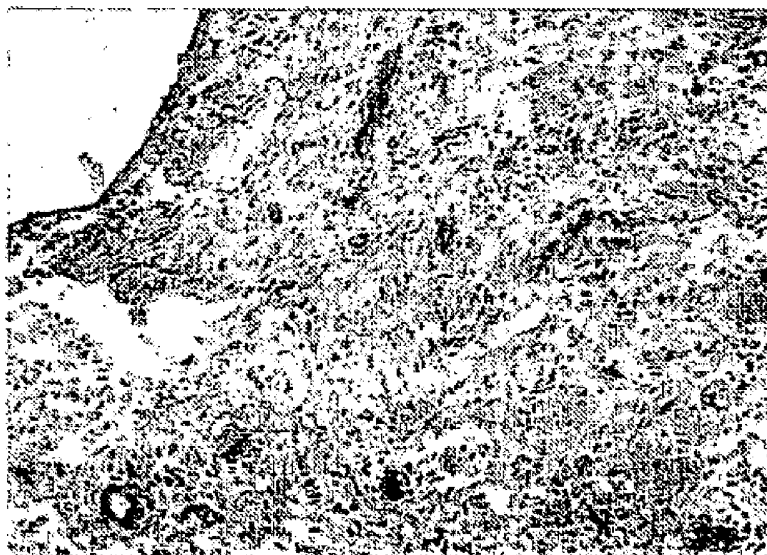


FIG. 12

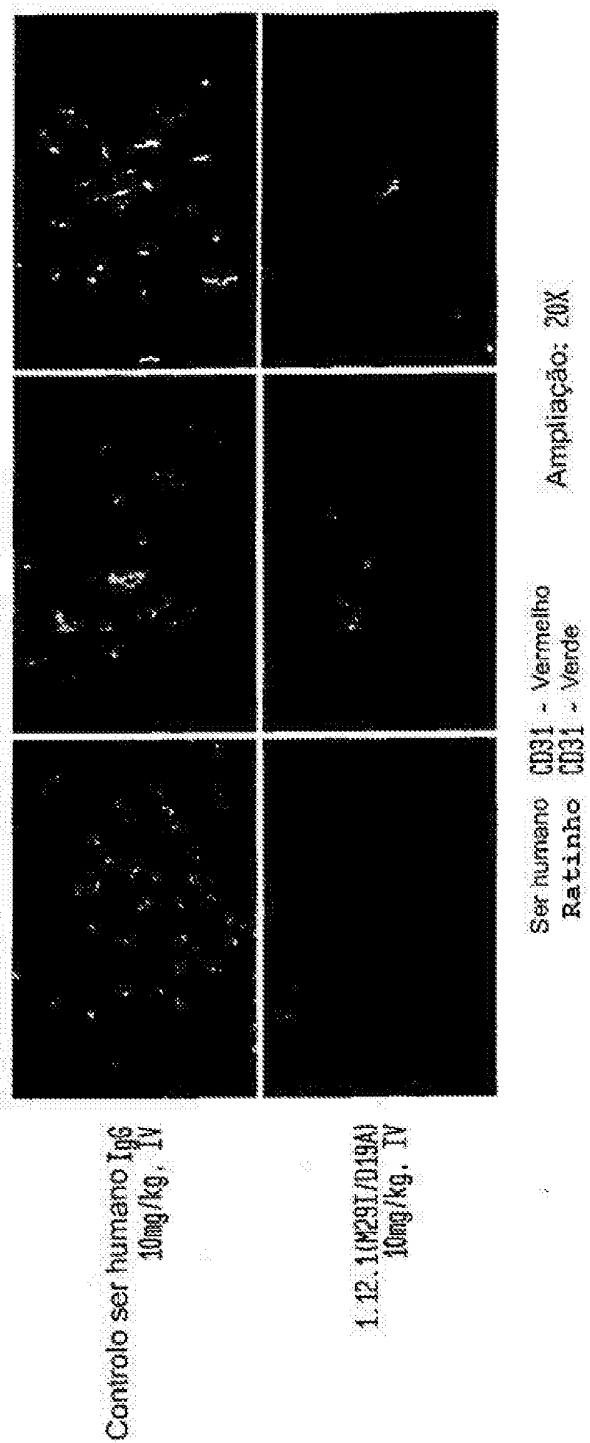


FIG. 13

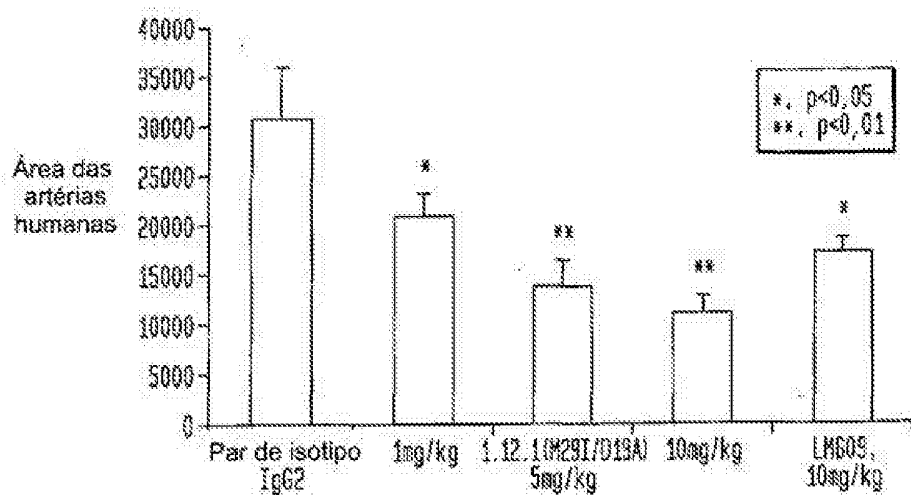


FIG. 14

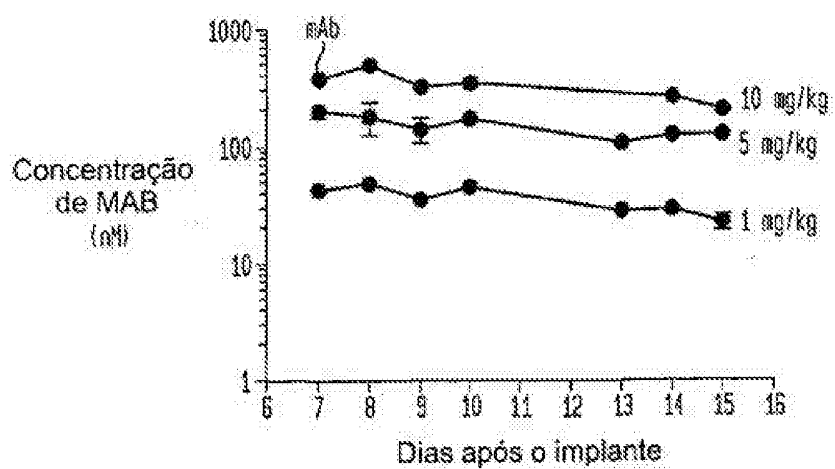


FIG. 15

