

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 260**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2016 PCT/KR2016/009801**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17039358**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2016 E 16842324 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2023 EP 3345613**

54 Título: **Composición para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis que comprende una proteína de fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente anti-VEGF**

30 Prioridad:

01.09.2015 KR 20150123878

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.10.2023

73 Titular/es:

**IL DONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
 2, Baumoe-ro 27-gil, Seocho-gu
 Seoul 06752, KR**

72 Inventor/es:

**KWON, HYUK-SANG;
 KO, JONG-HEE;
 LEE, YOUNG-MIN;
 JUNG, HYEI-YOON;
 YANG, SEOK-WOO;
 KANG, JAE-HOON y
 KIM, YONG-SUNG**

74 Agente/Representante:

MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 951 260 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis que comprende una proteína de fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente anti-VEGF

5

Campo técnico

La presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, comprendiendo la composición, como principio activo, una proteína de fusión obtenida por fusión de un péptido de penetración tumoral y un anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) seleccionado de un grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos, en la que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7. La proteína de fusión tiene un excelente efecto inhibidor de la angiogénesis al mejorar la penetración tumoral de un agente antiangiogénico y ejercer el efecto dirigido al cáncer y puede exhibir un efecto terapéutico incluso en cánceres que muestran resistencia o falta de respuesta al agente antiangiogénico al mejorar la eficacia del agente antiangiogénico .

Técnica antecedente

La presente solicitud reivindica prioridad y el beneficio de la Solicitud de Patente Coreana No. 10-2015-0123878 presentada el 1 de septiembre de 2015.

La angiogénesis se refiere a un proceso mediante el cual se forman nuevos capilares a partir de microvasos preexistentes. La angiogénesis es una acción fisiológica normal y se sabe que juega un papel importante en el desarrollo, la cicatrización de heridas y los ciclos reproductivos femeninos. Además, existen varias enfermedades causadas por la falta de autorregulación de la angiogénesis y el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, se sabe que la angiogénesis anormalmente excesiva juega un papel decisivo en el crecimiento y la metástasis del cáncer y enfermedades tales como la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad, la artritis reumatoide, la endometriosis, la psoriasis y la inflamación crónica. Por el contrario, la angiogénesis insuficiente es causa de enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, úlcera o cicatrización retardada de heridas.

Entre estas enfermedades, el cáncer se refiere a una enfermedad en la que las células que constituyen el cuerpo se dividen irregularmente por la acción de un cierto factor cancerígeno y, por lo tanto, las células *per se* están fuera del control corporal, lo que da como resultado una proliferación desordenada. Además, las células invaden los tejidos circundantes y producen metástasis a distancia en otros órganos a través de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y similares, lo que provoca trastornos. El descuido de tal estado es fatal y, por lo tanto, el estado se denomina tumor maligno o neoplasia maligna, mientras que tales células se denominan células cancerosas o células malignas.

Existen diversas terapias dependiendo del tipo de cáncer, aunque generalmente se utilizan cirugía, quimioterapia inductora de apoptosis, radioterapia, terapia dirigida a células cancerosas, inmunoterapia, terapia de alta temperatura, trasplante de células madre, terapia fotodinámica y similares. Recientemente se han llevado a cabo a menudo terapias dirigidas para minimizar los efectos adversos debidos a la alteración de las células normales y para aumentar la eficacia de los fármacos, mientras que los tipos de las mismas incluyen un bloqueador de señales para inhibir el crecimiento específico del cáncer, un inhibidor de la angiogénesis para bloquear el suministro de oxígeno y nutrientes a las células cancerosas, un inductor de la apoptosis, un potenciador de la inmunidad y similares.

La angiogénesis, que es un proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes, es uno de los procesos necesarios para la génesis y el desarrollo de los vasos sanguíneos, la división y el crecimiento de células y tejidos normales, y la división y el crecimiento de las células cancerosas.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los varios factores de crecimiento involucrados en la angiogénesis, mientras que se sabe que el papel de VEGF-A entre los factores es importante. El anticuerpo monoclonal anti-VEGF, bevacizumab (Avastin), que inhibe específicamente el VEGF-A para suprimir la angiogénesis, fue aprobado como medicamento primario o secundario para el cáncer de colon metastásico en combinación con 5-fluorouracilo por la FDA y la EMA en 2004 y 2005, respectivamente. Posteriormente, bevacizumab (Avastin) también fue aprobado, luego de cientos de ensayos clínicos, como medicamento para el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el cáncer renal metastásico, el carcinoma de células no pequeñas

metastásico, el glioblastoma progresivo y el cáncer de mama metastásico.

Los agentes anti-VEGF, como Avastin, pueden dirigirse contra el cáncer acompañados de angiogénesis activa. Sin embargo, los efectos secundarios de los agentes anti-VEGF dependen de la dosis en órganos como el riñón y el estómago, ya que los agentes afectan no solo al cáncer sino también a otros órganos con niveles altos de VEGF.

Además de VEGF-A, otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el sistema de ligando/receptor de muesca, el factor de crecimiento de placenta (P1GF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), están involucrados en los mecanismos de señalización para la angiogénesis. Por lo tanto, aunque el VEGF-A sea bloqueado por agentes anti-VEGF, como Avastin, es posible una compensación a través de otros mecanismos. Por lo tanto, se supone que muchos pacientes no responden a los agentes anti-VEGF, como Avastin, o tienen resistencia a los mismos debido a la administración repetida de Avastin, lo que no produce ningún efecto aparente.

Dado que los agentes anti-VEGF, como Avastin, poseen una potente actividad anticancerígena al bloquear la señalización mediada por VEGF-A para inhibir la angiogénesis, se pueden usar como un agente eficaz que puede aplicarse, solo o en una terapia combinada, a varios carcinomas incluidos los cánceres metastásicos intratables. Sin embargo, los agentes anti-VEGF presentan resistencias y efectos secundarios debido a los mecanismos de acción y dosis de los mismos, por lo que los agentes anti-VEGF muestran efectos clínicos menores a los esperados y se usan de forma restrictiva. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes capaces de superar tales desventajas de los agentes anti-VEGF, como Avastin y aumentar su eficacia.

T. H. Shin et al. (Molecular Cancer Therapeutics, vol. 13, no. 3, 2014, páginas 651-661) describe un formato de anticuerpo sólido dirigido a tumores con extravasación vascular mejorada y actividad de penetración tumoral.

Ye-Jin Kim et al. (Journal of Controlled Release, vol. 216, 2015, páginas 56-68) describe un péptido fusionado con inmunoglobulina Fc, Fc-TPP11, que se une específicamente al sitio de unión a VEGF de NRP1 con una afinidad de aproximadamente 2 nM, pero insignificante a la de NRP2.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

Los presentes inventores descubrieron que una proteína de fusión, que se forma mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) para su uso en un procedimiento como se define en la reivindicación 8, puede aumentar la penetración tumoral del agente anti-VEGF, mejorar la comodidad del paciente y reducir los efectos secundarios dependientes de la dosis, ya que su efecto dirigido contra el cáncer es ejercido por TPP para reducir su dosis alta, y vencer una resistencia derivada del cambio del microambiente perivascular debido al uso continuo del agente anti-VEGF, y luego se completó la presente invención.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, comprendiendo la composición, como principio activo, una proteína de fusión obtenida por fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) seleccionado de un grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos, en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una proteína de fusión que se forma mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, en el que el agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) se selecciona del grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos, en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, comprendiendo la composición, como principio activo, una proteína de fusión obtenida por fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) seleccionado de un grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos, en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína de fusión que se forma mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, en el que el agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) se selecciona del grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos, en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

Se describe y no se reivindica un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, en el que la composición comprende, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

Se describe y no se reivindica un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, en el que la composición consiste en, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

Se describe y no se reivindica un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, en el que la composición consiste esencialmente en, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

Se describe y no se reivindica el uso de una proteína de fusión para la preparación de un agente para inhibir la metástasis del cáncer, formándose la proteína de fusión mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

Se describe y no se reivindica un procedimiento para inhibir la metástasis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, en el que la composición comprende, como principio activo, una proteína de fusión formada por fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

Se describe y no se reivindica un procedimiento para inhibir la metástasis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, en el que la composición consiste en, como principio activo, una proteína de fusión formada por fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

Se describe y no se reivindica un procedimiento para inhibir la metástasis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, en el que la composición consiste esencialmente en, como principio activo, una proteína de fusión formada por fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

65

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, comprendiendo la composición, como principio activo, una proteína de fusión obtenida por fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) seleccionado de un grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos,

en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión que se forma mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, en el que el agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) se selecciona del grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos,

en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

El factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) es bien conocido por inducir la extravasación. Esto también se llama factor de permeabilidad vascular. Se sabe que esta acción es inducida por su unión a un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), mientras que, curiosamente, los experimentos de mutación en el factor de crecimiento endotelial vascular-A mostraron que la permeabilidad vascular del factor de crecimiento endotelial vascular-A aumentó a pesar de que el factor de crecimiento endotelial vascular-A no se pudo unir al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular. Esto sugirió que existe otro receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular-A (Stacker et al., 1999).

La neuropilina fue encontrada por primera vez en el sistema nervioso de *Xenopus* por Takagi et al., (1987) y Fujisawa et al., (1989). La neuropilina es una glicoproteína transmembrana, mientras que existen dos tipos de neuropilinas, NRP1 y NRP2. La neuropilina actúa como co-receptor de los receptores de VEGF (VEGFR) al unirse al ligando de la familia VEGF. A través del cambio en la afinidad de unión entre VEGF₁₆₅ y VEGFR2 por parte de NRP1, se reveló que NRP1 se une a varios ligandos de VEGF al actuar como co-receptor para VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, mejorando así la fuerza de unión entre un ligando y un receptor (Soker et al., 1998). Por otro lado, NRP2 contribuye a la linfangiogénesis y adhesión celular al actuar como co-receptor de VEGFR2 y VEGFR3. Además, mientras actúa como co-receptor para los receptores de la familia Plexin, NRP1/NRP2 (NRP1/2) se une a los ligandos de semaforina de clase 3 secretados (Sema3A, Sema3B, Sema3C, Sema3D, Sema3E, Sema3F y Sema3G).

NRP1 actúa como co-receptor con VEGFR-2 para aumentar la migración celular y la angiogénesis en las células endoteliales y participar en el procedimiento de reconstrucción vascular en el que los pericitos cubren los vasos sanguíneos y, por lo tanto, NRP1 es un factor principal en el desarrollo vascular. Además, NRP1 aumenta la expresión de la cadherina endotelial vascular (VE) y la molécula de adhesión celular específica del epitelio (cadherina E) para mantener la unión adherente entre las células. Especialmente, NRP1 se expresa en gran medida en varias líneas celulares de cáncer, incluido el cáncer de pulmón, mama, próstata, páncreas e intestino grueso, mientras que se sabe que en pacientes con carcinoma colorrectal avanzado, la alta expresión de NRP1 da como resultado una alta posibilidad de metástasis del cáncer. a los ganglios linfáticos o al hígado y conduce a una tasa de supervivencia corta. Como tal, la relación entre NRP1 y la metástasis del cáncer también ha sido verificada clínicamente.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "de penetración tumoral" se refiere al hecho de tener una cualquiera característica entre reconocer específicamente los tejidos que sobreexpresan NRP y acumularse en los mismos, aumentar la brecha celular entre las células endoteliales vasculares para promover la extravasación de fármacos y ajustar la brecha entre las células de la córnea, que son un tejido que actúa como barrera contra las moléculas solubles en agua, para promover la distribución de un fármaco en el tejido.

Dentro de la presente invención, el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

La angiogénesis requiere una serie de procesos diversos y complicados, tales como el simple crecimiento de células endoteliales vasculares, la invasión de células endoteliales en las membranas basales, la migración y diferenciación de las mismas y la formación de capilares. Se han informado muchos promotores e inhibidores para controlar el proceso angiogénico. Además, se necesita la activación de enzimas histolíticas y similares para la angiogénesis, mientras que tal serie de procesos es muy similar al procedimiento de invasión de células cancerosas.

El factor promotor de la angiogénesis más conocido es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF tiene un tamaño de 32-44 kDa, se secreta en casi todas las células y está altamente correlacionado con la invasión tumoral (Takahashi et al., 1995). Anteriormente se sabía que VEGF era un factor de permeabilidad vascular y mostraba un efecto de extravasación 50.000 veces más potente que la histamina (Senger et al., 1983). Las características de tales características de extravasación mueven las proteínas en la sangre fuera de los vasos sanguíneos para ayudar a la formación de nuevos vasos sanguíneos.

En los últimos años, las proteínas de angiopoyetina han sido recientemente aisladas y purificadas y se sabe que desempeñan un papel clave en la formación de estructuras angiogénicas. Las proteínas de angiopoyetina (ANG) se clasifican en Ang-1 y Ang-2, que se unen al receptor Tie-2 específicamente presente en las células endoteliales. Ang-1 participa en la diferenciación y estabilización de las células endoteliales, mientras que Ang-2 se une al receptor Tie-2 para inhibir la unión de Ang-1, lo que da como resultado la no estabilización y la regresión vascular de las células endoteliales. Para la angiogénesis en tejidos cancerosos, las células cancerosas primero seleccionan un vaso sanguíneo existente y se someten a cooptación vascular y regresión vascular, que están mediadas por Ang-2 (Holash et al., 1999).

Se sabe que la angiogénesis se promueve mediante la activación de una serie de receptores que utilizan varios ligandos que incluyen, además de VEGF y ANG mencionados anteriormente, factor de crecimiento de placenta (P1GF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), efrina, interleucina y proteína morfogenética ósea (BMP).

Generalmente, la "antiangiogénesis" incluye moléculas que interfieren con las interacciones entre moléculas relacionadas con la angiogénesis y receptores naturales, por ejemplo, moléculas que se unen a VEGF o receptores de VEGF para prevenir o inhibir interacciones entre VEGF y receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-receptor de VEGF y moléculas quiméricas basadas en el receptor de VEGF. La "antiangiogénesis" también incluye moléculas que se unen a PDGF, P1GF, FGF, TGF, ANG, HGF, IGF, efrina A, interleucina, BMP y sus receptores para prevenir o inhibir las interacciones entre los mismos. Los antagonistas de los mismos incluyen anticuerpos anti-PDGF, anti-P1GF, anti-FGF, anti-TGF, anti-ANG, anti-HGF, anti-IGF, anti-efrina A, antiinterleucina y anti-BMP, y anticuerpos antagonistas para los respectivos receptores y moléculas quiméricas basadas en receptores.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "fusión" se refiere a la integración de dos moléculas con funciones o estructuras iguales o diferentes, y puede ser una fusión por cualquier procedimiento físico, químico o biológico mediante el cual un péptido de penetración tumoral se puede unir a un agente antiangiogénico. La fusión se puede llevar a cabo preferentemente mediante un péptido enlazador, y dicho péptido enlazador puede unirse, por ejemplo, al extremo C del fragmento Fc en un anticuerpo.

Dentro de la presente invención, la proteína de fusión se forma mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, en el que el agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) se selecciona del grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos,

en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

Mientras tanto, los agentes antiangiogénicos son fármacos eficaces que se pueden aplicar solos o en una terapia combinada a varios tipos de cáncer, incluidos los cánceres metastásicos intratables, ya que los agentes antiangiogénicos tienen una alta actividad anticancerígena al bloquear la señalización relacionada con la angiogénesis para inhibir la angiogénesis. No obstante, los agentes antiangiogénicos presentan resistencias y efectos secundarios debido a los mecanismos de acción y dosis de los mismos, por lo que los agentes antiangiogénicos muestran una eficacia clínica inferior a la esperada y se utilizan de manera restrictiva. El agente antiangiogénico utilizado en la presente invención es un agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) seleccionado de un grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept,

conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos. Se sabe que el agente anti-VEGF, Avastin (nombre genérico: bevacizumab), que es uno de los fármacos más representativos entre los agentes antiangiogénicos, no es un fármaco dirigido específico contra el cáncer, a diferencia de otros medicamentos de anticuerpos, y por lo tanto, Avastin necesita administrarse a una dosis alta para ejercer su eficacia y puede distribuirse no solo en tejidos cancerosos sino también en otros tejidos con un alto nivel de VEGF, lo que resulta en efectos secundarios adversos.

La proteína de fusión para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 se dirige a NRP1 y NRP2 que se distribuyen abundantemente en el cáncer, ya que un péptido de penetración tumoral que se dirige a la NRP se fusiona con el agente anti-VEGF, en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7, y el agente anti-VEGF se selecciona del grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos, de modo que la proteína de fusión pueda aumentar los efectos específicos contra el cáncer del agente antiangiogénico para reducir la dosis del mismo, aumentando así la comodidad del paciente y reduciendo los efectos secundarios dependientes de la dosis.

Además, NRP1 se une a VEGF-A y a otros factores de crecimiento, como VEGF-B, -C, -D, -E y PDGF, mientras actúa como co-receptor junto con VEGFR-1 o -2, por lo que la unión de NRP1 y los factores de crecimiento se inhibe a través del péptido de penetración tumoral fusionado en la proteína de fusión para el uso de la presente invención, aumentando así el efecto inhibitorio de la angiogénesis del agente anti-VEGF.

En la presente invención, una composición farmacéutica para su uso se caracteriza porque el cáncer o la enfermedad relacionada con la angiogénesis pueden ser resistentes o no responder al agente anti-VEGF.

El término "resistente" o "no responsivo" se refiere a una propiedad que no muestra ningún efecto terapéutico a una concentración de fármaco a la que generalmente se muestra un efecto terapéutico.

Además de VEGF-A, otros factores de crecimiento, como FGF, sistema de ligando/receptor de muesca, P1GF y PDGF-BB, están involucrados en los mecanismos de señalización para la angiogénesis y, por lo tanto, aunque una señal esté bloqueada, la angiogénesis puede ocurrir continuamente como una acción de compensación a través de otros mecanismos. Por lo tanto, se supone que muchos pacientes no son responsivos a los agentes antiangiogénicos o tienen resistencia a los mismos debido a la administración repetida, lo que no produce un efecto terapéutico aparente.

En la presente invención, el agente anti-VEGF sirve como agente antiangiogénico. En la angiogénesis, el crecimiento vascular ocurre a través de la división celular y el crecimiento a una alta concentración de VEGF. Posteriormente, a medida que disminuye la concentración de VEGF, aumenta la concentración de PDGF y, por lo tanto, se produce la normalización o reconstrucción vascular. El procedimiento de normalización comprende, junto con una disminución del número y tamaño de los vasos sanguíneos inmaduros, un proceso de reducción de la presión vascular por el líquido intersticial debido a la cobertura de pericitos de los vasos sanguíneos. En los casos en que la concentración de VEGF se reduce mediante la administración de un agente anti-VEGF, como Avastin, la cobertura de pericito vascular aumenta a través de la normalización, lo que reduce la penetración de un fármaco en los tejidos cancerosos. Se ha informado que la administración conjunta de Avastin y docetaxel a pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en realidad redujo la penetración del fármaco en el cáncer. Estos resultados indican que la administración conjunta de un agente anti-VEGF, como Avastin, y otro fármaco tiene una limitación y provoca resistencia al agente anti-VEGF.

Mientras tanto, la proteína de fusión para el uso de la presente invención tiene un agente anti-VEGF y un péptido de penetración tumoral fusionado al mismo como se define en la reivindicación 8, siendo el péptido de penetración tumoral capaz de unirse directamente y actuar sobre la NRP como se define en la reivindicación 8, mientras que NRP está involucrada en la reconstrucción vascular a través de la asociación de pericitos. Por lo tanto, el péptido de penetración tisular en la proteína de fusión para uso de la presente invención inhibe la NRP como se define en la reivindicación 8, suprimiendo así directamente el desarrollo angiogénico y superando la resistencia derivada del cambio del microambiente perivascular debido al uso continuo del agente anti-VEGF.

Además, dado que NRP1 regula la expresión de cadherina VE y cadherina E involucrada en el mantenimiento de la unión intercelular, la proteína de fusión para uso de la presente invención afloja la brecha intercelular al inhibir NRP1 como se define en la reivindicación 8, aumentando así la capacidad de penetración de un fármaco coadministrado, como un medicamento de anticuerpos existente, y las células inmunitarias en la masa cancerosa, aumentando así la eficacia del fármaco.

De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, los presentes inventores evaluaron diversas actividades fisiológicas mediante la fabricación de una proteína de fusión Avastin-A22p en la que un péptido de penetración tisular A22p se fusiona con el extremo C de un agente anti-VEGF, Avastin, y una proteína de fusión Avastin-TPP11 en la que se fusiona TPP11 a la misma. Específicamente, las proteínas de fusión para su uso de acuerdo con la presente invención mostraron (i) una excelente capacidad de unión a NRP1 y VEGF (Ejemplo 2), (ii) una capacidad de direccionamiento contra el cáncer y una capacidad de penetración en tejidos significativamente mejoradas en comparación con Avastin de tipo salvaje (Ejemplo 3), (iii) una cobertura de pericitos significativamente reducida, que se supone que es un mecanismo de resistencia de un agente anti-VEGF (Ejemplo 4), y (iv) excelente actividad antitumoral incluso en modelos animales de tumores (Ejemplo 5).

La razón por la cual la proteína de fusión para el uso de la presente invención muestra excelentes actividades fisiológicas como las anteriores se considera que el agente anti-VEGF y el péptido de penetración tumoral exhiben un efecto sinérgico al actuar simultáneamente sobre VEGF y NRP1 como se define en la reivindicación 8, respectivamente.

La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención se puede formular en una forma adecuada que contenga la proteína de fusión sola o junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y además puede contener un excipiente o un diluyente. El término composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición no tóxica que es fisiológicamente aceptable y que no provoca una respuesta alérgica, como un trastorno gastrointestinal o vértigo, o respuestas similares, cuando se administra a seres humanos.

Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable pueden incluir además un vehículo para administración oral o un vehículo para administración parenteral. El vehículo para administración oral puede incluir lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Además, el vehículo para administración oral puede incluir diversos materiales de administración de fármacos utilizados para la administración oral de preparaciones peptídicas. Además, el vehículo para administración parenteral puede incluir agua, aceite adecuado, solución salina, glucosa acuosa y glicol, y puede incluir además un estabilizador y un conservante. Los ejemplos adecuados del estabilizador incluyen un antioxidante, tal como hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio o ácido ascórbico. Los ejemplos adecuados del conservante incluyen cloruro de benzalconio, metil- o propil-parabeno y clorobutanol. La composición farmacéutica para uso de la presente invención puede contener adicionalmente, además de los ingredientes anteriores, un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, un agente de suspensión y similares. En la literatura se puede hacer referencia a otros vehículos y preparaciones farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

La composición para uso de la presente invención se puede administrar a mamíferos, incluidos los seres humanos, por cualquier procedimiento. Por ejemplo, la composición para uso de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral. La administración parental puede ser, pero no se limita a, administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intradural, intracardiaca, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intestinal, tópica, sublingual o rectal.

La composición farmacéutica para uso de la presente invención se puede formular como un agente para administración oral o administración parenteral de acuerdo con la vía de administración descrita anteriormente.

Para un agente para administración oral, la composición para uso de la presente invención se puede formular en forma de polvo, gránulos, comprimido, píldora, comprimido recubierto de azúcar, cápsula, líquido, gel, jarabe, una mezcla líquida espesa y una suspensión, mediante los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el comprimido o el comprimido recubierto de azúcar para administración oral se puede obtener mezclando un principio activo con un excipiente sólido, pulverizando la mezcla, añadiéndole un adyuvante adecuado y luego procesando la mezcla en una mezcla de gránulos. Los ejemplos adecuados del excipiente pueden incluir: azúcares que incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; almidones que incluyen almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; celulosas que incluyen celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio e hidroxipropilmetilcelulosa; y rellenos, tales como gelatina y polivinilpirrolidona. En algunos casos, se puede añadir polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o alginato de sodio como desintegrante. Además, la composición farmacéutica para uso de la presente invención puede contener además un anticoagulante, un lubricante, un agente humectante, un agente saborizante, un emulsionante y un conservante.

Para agentes para administración parenteral, la composición para uso de la presente invención puede ser formulada en forma de inyección, crema, loción, ungüento externo, aceite, humectante, gel, aerosol e inhalador nasal, mediante los procedimientos conocidos en la técnica. Estas formas de dosificación se describen en la literatura, que es un formulario generalmente conocido en todas las químicas farmacéuticas (Remington's Pharmaceutical Science, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

Una cantidad eficaz total de la composición para el uso de la presente invención se puede administrar a un

paciente en una dosis única o se puede administrar en dosis múltiples durante un período prolongado mediante un protocolo de tratamiento fraccionado. En la composición farmacéutica para uso de la presente invención, el contenido del principio activo puede variar dependiendo de la severidad de la enfermedad. Una dosis total de la composición farmacéutica para el uso de la presente invención puede ser preferentemente de aproximadamente 5 0,01 µg a 10.000 mg, y más preferentemente de 0,1 µg a 1000 mg con respecto a 1 kg de peso corporal del paciente por día. En cuanto a la dosis de la composición farmacéutica para el uso de la presente invención, la dosis efectiva para un paciente se determina de acuerdo con varios factores, tal como el procedimiento de formulación, la vía de administración, el número de veces que se realiza el tratamiento, la edad del paciente, el peso corporal, estado de salud y sexo, severidad de la enfermedad, ingesta de alimentos y tasa de excreción. 10 Por lo tanto, considerando estos factores, un experto en la técnica podría determinar una cantidad eficaz apropiada de la composición para el uso de la presente invención. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la presente invención no se limita particularmente a la forma de dosificación, vía de administración y procedimiento de administración de la misma.

15 En la presente invención, el agente anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) se selecciona del grupo que consiste en bevacizumab, ranibizumab, r84 (PLoS One. 6 de agosto de 2010; 5(8)), aflibercept, conbercept, CT01 (WO2005056764A2), DOM15-10-11 (WO2008149147A2), DOM15-26-593 (WO2008149143A2), ESBA903 (Eur J Pharm Biopharm. 14 de marzo de 2015. pii: S0939-6411(15)00089-2), EPI-0030 (WO2011023130A1) y un conjugado de anticuerpo-fármaco en el que se fusionan un anticuerpo anti-VEGF y un fármaco. Se describe y no se reivindica que el agente anti-VEGF abarca biosimilares y variantes de 20 los mismos. Más preferentemente, el agente anti-VEGF puede ser ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o conbercept, pero no se limita a los mismos.

25 El término "biosimilar", que no se reivindica, se refiere a una copia del producto médico que se verifica que tiene equivalencia en cuanto a calidad, eficacia y seguridad al imitar un producto médico biológico original sin patente que ya se ha desarrollado o comercializado mediante el uso de biotecnología, como la recombinación genética y la tecnología de cultivo celular.

30 Al tiempo que retiene la actividad fisiológica central del agente anti-factor de crecimiento endotelial vascular, la variante que no se reivindica incluye todas las secuencias similares que contienen una o más variaciones en las posiciones de los aminoácidos que no afectan dicha actividad. Es decir, la variante puede ser una variante funcional que es al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, aún más preferentemente al menos un 90%, y lo más preferentemente al menos un 95% idéntica a las secuencias de aminoácidos de los agentes anti-factor de crecimiento endotelial vascular enumerados anteriormente.

35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpos antagonistas de los receptores" se refiere a anticuerpos que pueden suprimir al menos una actividad biológica de los receptores de VEGF. Estos anticuerpos pueden mostrar funciones de inhibición de la señalización biológica molecular para la angiogénesis al inhibir la unión de los receptores a los ligandos. El anticuerpo puede incluir un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento scFv, y el anticuerpo incluye una forma del todo anticuerpo y un fragmento 40 funcional de la molécula de anticuerpo.

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "enfermedad relacionada con la angiogénesis" se refiere a una enfermedad provocada por la vasculogénesis en la que los capilares se extienden en la forma en que las células endoteliales vasculares brotan de un vaso sanguíneo existente e invaden los tejidos. Los ejemplos ilimitados de la enfermedad pueden incluir artritis reumatoide, psoriasis, inflamación, endometriosis y hemangioma.

50 En la presente invención, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer peritoneal, cáncer de piel, melanoma de piel o intraocular, cáncer de recto, cáncer perianal, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de glándulas endocrinas, cáncer de paratiroides, cáncer suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, 55 leucemia crónica o aguda, linfoma linfocítico, hepatoma, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, adenoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o de útero, tumor de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza o cuello, pero no se limita a los mismos.

60 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso como se define en la reivindicación 1, en la que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) o se une específicamente solo a la neuropilina 1 como se define en la reivindicación 1. El péptido de penetración tumoral que se une tanto a la neuropilina 1 como a la neuropilina 2 comprende una 65 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, mientras que

el péptido de penetración tumoral que se une específicamente solo a la neuropilina 1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

El péptido de penetración tisular representado por una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 puede unirse a las neuropilinas 1 y 2, y está diseñado basándose en los hechos de que se analiza la secuencia de aminoácidos de una región de unión del ligando VEGF₁₆₅, que se une al dominio blb2 de la neuropilina, y la longitud de la secuencia de aminoácidos, y se analizan las secuencias de nucleótidos de las secuencias del extremo C de furina de la semaforina 3A y la semaforina 3F, que se sabe que se unen a la neuropilina. y, por lo tanto, las secuencias de los extremos C de los mismos son similares entre sí.

El péptido de penetración tisular representado por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7 se une específicamente solo a la neuropilina 1 sin unirse a la neuropilina 2. Los presentes inventores aislaron y purificaron péptidos, que se derivaron mediante el diseño de bibliotecas de péptidos fusionadas con el extremo C de la región constante de la cadena pesada (Fc), expresando las bibliotecas de péptidos en superficies de células de levadura para construir bibliotecas de péptidos fusionadas con Fc y luego seleccionando clones que se unen selectivamente al dominio b1 de la neuropilina 1. Mientras tanto, para aislar los péptidos, que son específicos de la neuropilina 1 y se unen a la neuropilina 1 con alta afinidad, a partir de las bibliotecas de péptidos Fc, se fabricaron péptidos realizando una selección usando blb2 proteína del dominio blb2 de la neuropilina 1 y, al mismo tiempo, realizar una selección utilizando, como competidor de la misma, la proteína del dominio blb2 de la neuropilina 2.

Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7 son las siguientes:

TPP#1 (SEQ ID NO: 1)	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR
TPP#2 (SEQ ID NO: 2)	HTPGNSNKWKHLQENKKGRPRR
TPP#3 (SEQ ID NO: 3)	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR
TPP#4 (SEQ ID NO: 4)	REAPGAPRSPEPQDQKKPRPRR
TPP#5 (SEQ ID NO: 5)	HTPGNSNQFVLTSTRPPR
TPP#6 (SEQ ID NO: 6)	HTPGIATRTPR
TPP#7 (SEQ ID NO: 7)	HTPGNSKPTRTPR

En la presente invención, la proteína de fusión para su uso puede estar caracterizada porque el péptido de penetración tisular y el agente anti-VEGF se fusionan a través de un enlazador. El péptido enlazador puede estar compuesto de 1 a 100 aminoácidos, preferentemente de 4 a 20 aminoácidos, más preferentemente de 4 a 15 aminoácidos. Además, el péptido enlazador puede estar compuesto por glicina (G), serina (S) o alanina (A), y la secuencia del péptido enlazador puede ser preferentemente una secuencia de aminoácidos de (GA)_n o (GGGS)_m (siempre que n y m sean cada uno independientemente un número entero de 1 a 20), y más preferentemente una secuencia de aminoácidos de GAGA o (GGGS)_s. En una realización de la presente invención, la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 (GGGSGGGSGGGGS) fue usada como el enlazador.

De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, la proteína de fusión para uso, que es una fusión de Avastin y el péptido de penetración tumoral, puede ser una proteína de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o 10 como una cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 como una cadena ligera. Además, la proteína de fusión para uso, que es una fusión de una variante de Avastin y el péptido de penetración tumoral, es una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 como cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 como cadena ligera.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer como se define en la reivindicación 1, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral como se define en la reivindicación 1 y un agente anti-VEGF como se define en la reivindicación 1.

Además, preferentemente la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer como se define en la reivindicación 1, la composición farmacéutica que consiste en, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral, como se define en la reivindicación 1 y un agente anti-VEGF como se define en la reivindicación 1.

Además, preferentemente la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer como se define en la reivindicación 1, la composición farmacéutica que

consiste esencialmente en, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral, como se define en reivindicación 1 y un agente anti-VEGF, como se define en la reivindicación 1.

5 La metástasis del cáncer se refiere a la formación de nuevo cáncer a partir de la diseminación de células cancerosas derivadas del cáncer primario hacia otros órganos. Dado que la metástasis es una afección importante potencialmente mortal en varios pacientes con cáncer, la prevención o el control de la metástasis es un objetivo importante en la investigación del cáncer. Si bien la cirugía, la quimioterapia o la radioterapia son efectivas en el diagnóstico temprano del cáncer sin metástasis, los efectos de estas terapias se reducen cuando
10 hay metástasis en el momento del diagnóstico. Además, la metástasis a menudo se confirma durante o después de la terapia, mientras que la metástasis no ha sido confirmada al momento del diagnóstico.

La metástasis se compone de una serie de etapas: invasión, intravasación, detención, extravasación, colonización y similares. A través de este procedimiento, las células cancerosas se diseminan desde el órgano principal y, finalmente, forman cáncer en otros órganos. La invasión como su primera etapa es una etapa de iniciación de la metástasis y abarca un cambio en la interacción entre las células cancerosas o entre las células cancerosas y la matriz extracelular, la desintegración de los tejidos circundantes y la migración de las células cancerosas a los tejidos y similares.

20 En un ejemplo de la presente invención, se confirmó que el tratamiento de líneas de células tumorales que presentaban resistencia a Avastin con la proteína de fusión (Avastin-A22p) para uso de acuerdo con la presente invención inhibía significativamente la migración de células tumorales. Se considera que la razón es que la proteína de fusión para uso de acuerdo con la presente invención inhibe la señalización por otros factores de crecimiento además de VEGF-A y, por lo tanto, también muestra un excelente efecto inhibitorio de metástasis en
25 células tumorales que tienen resistencia a Avastin.

Mientras tanto, se sabe que la unión de PDGF a un receptor de PDGF en células cancerosas aumenta la fosforilación de la proteína p130cas para promover la migración e invasión de células cancerosas. Sin embargo, se confirmó que la fosforilación de la proteína p130cas, que no había cambiado significativamente con el
30 tratamiento con Avastin, se suprimió a un nivel de fosforilación de un grupo de control con el tratamiento con Avastin-A22p. Es decir, se puede considerar que la proteína de fusión para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 inhibe VEGF y también inhibe la señalización mediada por PDGF uniéndose a NRP1, suprimiendo así la migración e invasión de células tumorales por PDGF. Por lo tanto, se sugiere que la proteína de fusión para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 exhibe un efecto inhibitorio de metástasis eficaz incluso
35 en células tumorales que tienen resistencia a un agente anti-VEGF.

Por lo tanto, en la presente invención, el cáncer puede ser resistente o no responsivo a los agentes antiangiogénicos.

40 Se describe y no se reivindica el uso de una proteína de fusión para la preparación de un agente para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, formándose la proteína de fusión mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

45 Se describe y no se reivindica un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, comprendiendo la composición, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

50 Se describe y no se reivindica un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, consistiendo la composición, como principio activo, en una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

55 Se describe y no se reivindica un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, consistiendo la composición, como principio activo, esencialmente en una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

60 Se describe y no se reivindica el uso de una proteína de fusión para la preparación de un agente para inhibir la metástasis del cáncer, formándose la proteína de fusión mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

65 Se describe y no se reivindica un procedimiento para inhibir la metástasis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite,

comprendiendo la composición, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

5 Se describe y no se reivindica un procedimiento para inhibir la metástasis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, consistiendo la composición, como principio activo, en una proteína de fusión formada por fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

10 Se describe y no se reivindica un procedimiento para inhibir la metástasis en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que lo necesite, consistiendo la composición, como principio activo, esencialmente en una proteína de fusión formada por fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente antiangiogénico.

15 El término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que muestra un efecto de alivio, tratamiento, prevención, detección o diagnóstico de cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, o un efecto de inhibición o reducción de la metástasis del cáncer. El término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente a un mamífero, y especialmente a un animal que incluye a un ser humano, y puede ser una célula, tejido y órgano, o similar que se origina en un animal. El sujeto puede ser un paciente que necesite tales efectos.

20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "tratar" se refiere en términos generales a aliviar el cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis o los síntomas del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, y puede incluir la curación, la prevención sustancial o el alivio de la condición de estas enfermedades, y puede incluir aliviar, curar o prevenir uno o la mayoría de los síntomas resultantes del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, pero no se limita a ello.

25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "que comprende" se usa como sinónimo de "comprendiendo" o "estando caracterizado por", y no excluye ingredientes o etapas adicionales que no se mencionan en las composiciones y procedimientos. El término "que consiste en" excluye elementos, etapas o ingredientes adicionales que no se indiquen de otro modo. El término "que consiste esencialmente en" significa que, en vista de las composiciones o procedimientos, el término incluye los materiales o etapas descritos, así como cualquier material o etapa que no afecte sustancialmente las características básicas de los mismos.

Efectos ventajosos

35 La composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral como se define en la reivindicación 1 y un agente anti-VEGF como se define en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis como se define en la reivindicación 1, puede mejorar la penetración tumoral del agente anti-VEGF como se define en la reivindicación 1, puede ejercer un efecto dirigido al cáncer, exhibiendo así excelentes efectos de tratamiento incluso con una pequeña dosis, reduciendo así los efectos secundarios del agente anti-VEGF, y puede exhibir excelentes efectos de tratamiento incluso sobre el cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis que tenga resistencia al agente antiangiogénico mediante la unión de un factor de crecimiento de angiogénesis y NRP1 al mismo tiempo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de una proteína de fusión (Avastin-A22p) formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un anti-factor de crecimiento endotelial vascular.

50 La Figura 2 muestra los resultados de SDS-PAGE de la confirmación de una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un anti-factor de crecimiento endotelial vascular (Carril 1: Avastin, Carril 2: Avastin-A22p, Carril 3: Avastin-TPP11).

La Figura 3 muestra los resultados de SE-HPLC de la confirmación de una proteína de fusión (Avastin-A22p) formada por fusión de un péptido de penetración tumoral y un anti-factor de crecimiento endotelial vascular. (A: Avastin, B: Avastin-A22p).

55 La Figura 4 muestra los resultados de la evaluación de la fuerza de unión de Avastin-A22p con NRP1 o VEGF (A: fuerza de unión con NRP1, B: fuerza de unión con VEGF).

60 La Figura 5 muestra los resultados de la observación de la distribución de proteínas en tejidos cancerosos a través de microscopía fluorescente en el tiempo transcurrido de 3, 8 y 16 horas después de la administración de Avastin y Avastin-A22p en modelos animales de xenoinjerto SW620 (Veh: grupo administrado con solución salina).

La Figura 6 muestra los resultados de la evaluación del cambio de cobertura de pericitos en células cancerosas en el tratamiento con Avastin-A22p (PECAM1: tinción de vasos sanguíneos, NG2: tinción de pericitos).

La Figura 7 muestra los resultados de la evaluación de la eficacia anticancerígena de Avastin-A22p en modelos animales de xenoinjerto SW620.

65 La Figura 8 muestra los resultados de la confirmación del efecto inhibidor de la migración cuando las células

HCT116/bev que mostraban resistencia a Avastin se trataron con VEGF para inducir la migración y luego se trataron con Avastin 1 μ M o Avastin-A22p (A: imágenes microscópicas, B: resultados de observaciones microscópicas cuantificados y representados como un gráfico).

La Figura 9 muestra los resultados de la confirmación de la fosforilación de la proteína p130cas cuando las células U87MG se trataron con 25 μ g/ml de Avastin o Avastin-A22p y, después de 30 min, se trataron con 50 ng/ml de PDGF, para investigar si Avastin-A22p inhibe la señalización mediada por PDGE (A: resultados de transferencia Western, B: gráfico para cuantificar los resultados de transferencia Western, A22p+P: Avastin-A22p 25 μ g/ml + PDGF 50 ng/ml, P: PDGF 50 ng/ml, C: control, A+P: Avastin 25 μ g/ml + PDGF 50 ng/ml).

La Figura 10 muestra los resultados de SDS-PAGE de la confirmación de una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un anti-factor de crecimiento endotelial vascular (Carril 1: Avastin(V)-A22p, Carril 2: Avastin-A22p).

La Figura 11 muestra los resultados de SE-HPLC de la confirmación de una proteína de fusión formada por la fusión de un péptido de penetración tumoral y un anti-factor de crecimiento endotelial vascular (A: Avastin(V)-A22p, B: Avastin-A22p).

La Figura 12 muestra los resultados de la evaluación de la fuerza de unión de Avastin(V)-A22p con NRP1 o VEGF, en comparación con Avastin-A22p (A: fuerza de unión con NRP1, B: fuerza de unión con VEGF).

Modo para llevar a cabo la invención

A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

Los siguientes Ejemplos son simplemente para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Fabricación de la proteína de fusión Avastin-péptido de penetración tisular (TPP)

Para aumentar la eficacia y superar la resistencia con respecto a un agente anti-VEGF, Avastin, los presentes inventores han intentado fusionar un péptido de penetración tisular (TPP), que es capaz de unirse tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 o específicamente uniéndose solo a la neuropilina 1, al extremo C de Avastin. Las secuencias de aminoácidos de TPP se muestran en la Tabla 1 a continuación. Entre la lista de secuencias de la Tabla 1, los TPP que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 pueden unirse a las neuropilinas 1 y 2, mientras que los TPP que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7 puede unirse específicamente solo a la neuropilina 1. En la Figura 1, se muestra un diagrama esquemático de una proteína de fusión en la que TPP se fusiona con Avastin.

Avastin, como se usa en la presente memoria descriptiva, es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 para una cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 para una cadena ligera, y se usa para el presente experimento después de la compra en www.Drugbank.com.

Mientras tanto, entre los TPP que se muestran en la Tabla 1, A22p como TPP que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se obtuvo modificando las regiones del extremo C de VEGF₁₆₅ como un ligando intrínseco de los ligandos de neuropilina y semaforina de clase 3; y TPP11 se obtuvo aislando e identificando un péptido derivado de clones que se unen selectivamente al dominio b1 de la neuropilina 1 usando tanto la proteína del dominio blb2 de la neuropilina 1 como la proteína del dominio blb2 de la neuropilina 2 como competidores. En este caso, se fusionó Avastin como enlazador para actuar como un bivalente en el receptor de neuropilina, de modo que estos péptidos se diseñaron para poseer una capacidad de penetración tisular mientras tenían una afinidad similar a los ligandos VEGF y Sema3A.

Tabla 1

Información de la secuencia de TPP	
TPP#1 (SEQ ID NO: 1)	HTPGNSNKWKHLQENKKGRNRR
TPP#2 (SEQ ID NO: 2)	HTPGNSNKWKHLQENKKGRPRR
TPP#3 (SEQ ID NO: 3)	REAPGAPRSPEPQDQKKPRNRR
TPP#4 (SEQ ID NO: 4)	REAPGAPRSPEPQDQKKPRPRR
TPP#5 (SEQ ID NO: 5)	HTPGNSNQFVLTSTRPPR
TPP#6 (SEQ ID NO: 6)	HTPGIATRTPR
TPP#7 (SEQ ID NO: 7)	HTPGNSKPTRTPRR

Específicamente, las proteínas de fusión en las que TPP (A22p) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y TPP (TPP11) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se fusionaron con el extremo

C de Avastin, respectivamente, y líneas celulares que producen las proteínas de fusión fueron fabricadas como se describe a continuación.

<1-1> Construcción del vector de expresión y transfección celular

5 Los genes marcadores de selección DHFR se insertaron en vectores pcADN3.1(-), y las cadenas pesada y ligera de Avastin-A22p y Avastin-TPP11 se clonaron mediante las enzimas de restricción NotI y BamHI, respectivamente. Un plásmido que codifica la proteína formada por la fusión de cada una de las regiones constantes pesadas del anticuerpo construido y un péptido que se une a NRP1 y un plásmido que codifica una proteína de cadena ligera se expresaron para la proteína en células CHO DG44 usando electroporesis Neon™. 10 En un matraz T25, se inocularon 3×10^6 células transfectadas con cada plásmido y se incubaron a 37 °C. Las células estables se aseguraron utilizando el marcador de selección y luego se cultivaron en estado flotante en SFM4CHO (Hyclone) sin suero durante 7 días en condiciones de 100 rpm, 37 °C, pH 7,2, CO₂ al 50% en un biorreactor. El sobrenadante se separó de las células mediante centrifugación y se esterilizó utilizando un filtro de 15 0,22 µm.

<1-2> Purificación de la proteína de fusión

20 Se recogieron los cultivos de Avastin, Avastin-A22p y Avastin-TPP11 y se purificaron sus respectivas proteínas con referencia a un protocolo estándar. Para la columna de purificación, la resina de proteína A (Resina MabselectSure, GE Healthcare) se empaquetó a 20 ml en la columna XK16/20 (Resina MabselectSure, GE Healthcare), a la que se aplicó una velocidad lineal de 200 cm/h. Se aplicó 1 l de anticuerpo a la columna de proteína A y la columna se lavó con un volumen de columna de 15 veces de PBS (pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM). El anticuerpo se eluyó con 100 ml de tampón de glicina 0,1 M a pH 3,0. 25 Las proteínas se recogieron entre 10 mAU y 10 mAU en la absorbancia UV a 280 nm, y 60 ml de las proteínas se neutralizaron a pH 7,0 usando 0,7 ml de tampón Tris 1 M. Las fracciones de anticuerpo se filtraron con un filtro de 0,2 µm (Milipore) y luego se concentraron usando un concentrador amicon (30 MWCO) (Milipore) a 3500 rpm durante 10 min, seguido de intercambio con tampón PBS (pH 7,4). La proteína de fusión purificada formada por la fusión de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo purificado y el péptido seleccionado que se une específicamente a NRP1 se cuantificó utilizando la absorbancia y el coeficiente de absorción a una longitud de onda corregida de 280 nm. La proteína de fusión purificada formada por la fusión de la región constante de la 30 cadena pesada del anticuerpo purificado y el péptido seleccionado que se une específicamente a NRP1 se analizó en SDS-PAGE al 10% en condiciones de reducción y no reducción.

35 Las proteínas se purificaron respectivamente de los cultivos recogidos de las líneas celulares que expresan Avastin, Avastin-A22p y Avastin-TPP11 y se separaron mediante SDS-PAGE. La Figura 2 confirmó que Avastin-A22p y Avastin-TPP11 formaron anticuerpos con éxito, los péptidos se fusionaron con Avastin en condiciones de reducción y Avastin-A22p y Avastin-TPP11 eran más grandes que Avastin en condiciones de reducción. Además, se confirmó que la fusión de TPP no afectó significativamente la expresión de anticuerpos ya que Avastin-A22p y Avastin-TPP11 se expresaron en niveles similares. 40

A fin de investigar la pureza de la proteína purificada Avastin-A22p, se realizó un ensayo de cromatografía de lípidos de alta resolución (HPLC). Se utilizó Agilent 1200 (Agilent) y se utilizó una columna de exclusión por tamaño (Biosuite 250, Waters). 45

En concreto, se utilizó como fase móvil una solución tampón (pH 6,2) que contenía fosfato potásico 0,2 M y cloruro potásico 0,25 M, y se dejó fluir hacia abajo a un caudal de 0,35 ml/min durante 20 min. Se comprobó el tamaño de la proteína según el tiempo de retención, y la pureza de la misma según el área y la altura.

50 Como se muestra en la Figura 3, la pureza de Avastin-A22p purificado se analizó usando SE-HPLC. Se confirmó que la pureza de Avastin-A22p era del 97% o superior y era mayor que la de Avastin.

Los presentes inventores, en lo sucesivo, fabricaron la proteína de fusión Avastin-A22p en la que A22p como un TPP que tenía la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 se fusionó con Avastin y 55 evaluaron su actividad.

Ejemplo 2: Capacidad de unión de la proteína de fusión Avastin-péptido de penetración tisular (TPP) a NRP1 y VEGF

60 A fin de evaluar si el extremo N de la proteína de fusión Avastin-A22p preparada en el Ejemplo 1 puede unirse a VEGF de la misma manera que Avastin, mientras que su extremo C puede unirse a NRP1 para bloquear así doblemente la señalización asociada, la unión de Avastin-A22p con NRP1 y VEGF respectivamente.

65 La capacidad de unión de Avastin-A22p purificado al dominio de Neuropilina 1-blb2 se investigó en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se utilizó Herceptin-A22p (HCT-A22p) como control positivo y

Avastin (Roche co., Swiss) como control negativo. La molécula diana del dominio de Neuropilina 1-blb2 (273-586) se hizo reaccionar a 1 µg por pocillo en la placa Maxibinding Immuno de 96 pocillos (SPL Life sciences., Corea) durante 2 h a 37 °C, y luego se lavó con 0,1% PBST (Tween20 al 0,1%, pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) durante 1 min tres veces. Después de la reacción con PBST al 0,1% que contenía leche desnatada al 5% durante 1 h, el producto de reacción se lavó tres veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Se utilizaron Herceptin-A22p como control positivo y Avastin (Roche co., Swiss) como control negativo. Avastin-A22p, como grupos experimentales, se diluyó con PBST al 0,1% a 50 nM, 25 nM, 12,5 nM y 6,25 nM, y luego las soluciones se trataron a 37 °C durante 1 h para cada concentración diferente y se lavaron con 0,1% PBST durante 1 min tres veces. El anticuerpo anti-cadena ligera kappa conjugado con HRP (mAb anti-cadena ligera kappa humana conjugado con peroxidasa de rábano picante, SIGMA-ALDRICH Co., EE. UU.) se diluyó 100.000 veces con PBST al 0,1 % que contenía un 5% de leche desnatada, seguido de tratamiento a 37 °C durante 30 min. A continuación, el producto de reacción se lavó cinco veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Para el desarrollo del color, el producto resultante se trató con el sustrato colorimétrico TMB HRP (Surmodics co., EE. UU.), seguido de la reacción a temperatura ambiente durante 10 min, el tratamiento con el mismo volumen de HCl 1 N (tampón de parada) y luego medición de absorbancia a 450 nm. La capacidad de unión del Avastin-A22p expresado y purificado al dominio de Neuropilina 1-blb2 se confirmó a través de los resultados de ELISA obtenidos.

La capacidad de unión del Avastin-A22p purificado al VEGF 165 humano recombinante (R&D Systems co. China) se investigó en ELISA. Se utilizaron Avastin como control positivo y HCT-A22p como control negativo. La molécula diana VEGF 165 humano recombinante se hizo reaccionar a 0,2 µg por pocillo en la placa Maxibinding Immuno de 96 pocillos durante 2 h a 37 °C y luego se lavó con PBST al 0,1% durante 1 min tres veces. Después de la reacción con PBST al 1% que contenía leche desnatada al 5% durante 1 h, el producto de reacción se lavó tres veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Se utilizó Avastin como control positivo y Herceptin-A22p como control negativo. Avastin-A22p, como grupos experimentales, se diluyó con 0,1% de PBST a 1,5 nM, 0,75 nM, 0,35 nM y 0,17 nM, y luego las soluciones se trataron a 37 °C durante 1 h para cada concentración diferente y se lavaron con 0,1% PBST durante 1 min tres veces. El anticuerpo anti-cadena ligera kappa conjugado con HRP se diluyó 100.000 veces con leche desnatada al 5% que contenía PBST al 0,1%, seguido de tratamiento a 37 °C durante 30 min. A continuación, el producto de reacción se lavó cinco veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Para el desarrollo del color, el producto resultante se trató con el sustrato colorimétrico TMB HRP, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 10 min, tratamiento con el mismo volumen de HCl 1 N y luego medición de absorbancia a 450 nm. La capacidad de unión del Avastin-A22p expresado y purificado al VEGF 165 humano recombinante se confirmó a través de los resultados de ELISA obtenidos.

Los resultados relacionados se muestran en la Figura 4.

Como se muestra en la Figura 4, se confirmó que Avastin-A22p se unía a NRP1 al mismo nivel que en HCT-A22p utilizado como control, y también se unía a VEGF al mismo nivel que en Avastin.

40 Ejemplo 3: Experimento de direccionamiento contra el cáncer de Avastin-A22p

Se sabe que Avastin no es un fármaco dirigido específico contra el cáncer, a diferencia de otros medicamentos de anticuerpos y, por lo tanto, Avastin debe administrarse en una dosis alta para ejercer su eficacia y puede distribuirse no solo en los tejidos cancerosos sino también en otros tejidos con un alto nivel de VEGF, lo que resulta en efectos secundarios adversos. Por lo tanto, se espera que el uso de la distribución específica del cáncer de NRP1 aumente el efecto de direccionamiento contra el cáncer para reducir la dosis, aumentando así la comodidad del paciente y reduciendo los efectos secundarios dependientes de la dosis. Los presentes inventores han intentado evaluar si Avastin-A22p puede dirigirse eficazmente contra el cáncer.

Con el fin de investigar si Avastin-A22p se distribuye mejor que Avastin en las células cancerosas al dirigirse a NRP1 presente en los nuevos vasos sanguíneos dentro de los tejidos cancerosos y la masa cancerosa, cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 250 mm³ después de que se trasplantara SW620 en ratones desnudos, PBS, Avastin-A22p o Avastin se administraron por vía intravenosa a 5 mg/kg, respectivamente, y los tumores se recolectaron en el tiempo transcurrido de 3, 8 y 16 h, y la distribución de proteínas en el tejido canceroso se investigó mediante inmunohistoquímica usando microscopios de fluorescencia.

Más específicamente, el tumor recolectado se seccionó a un espesor de 8 µm por un procedimiento de sección de parafina, y las células perivasculares se tiñeron, como anticuerpo primario, anticuerpo NG2 (tecnología de Cell Signaling, EE. UU.) y anticuerpo secundario conjugado con Alexa (fluorescencia roja, Life Technologies) reconociendo el anticuerpo NG2. Para observar Avastin y Avastin-A22p distribuidos en el tejido, se utilizó un anticuerpo conjugado con Alexa[®]488 (fluorescencia verde, Life Technologies) que reconoce IgG.

Los resultados relacionados se muestran en la Figura 5.

Como se muestra en la Figura 5, se confirmó que Avastin-A22p tenía una concentración mayor en el tejido

canceroso que Avastin desde 3 h después de la administración; a medida que pasaba el tiempo, una mayor cantidad de Avastin-A22p también se distribuía en células distantes de los vasos sanguíneos; y Avastin-A22p también redujeron de manera efectiva la angiogénesis dentro de la masa cancerosa.

5 A partir de los resultados de la presente observación microscópica fluorescente, se sugiere que se espera que Avastin-A22p tenga una excelente capacidad de detección del cáncer y capacidad de penetración tisular en comparación con Avastin, mientras que Avastin-A22p, a diferencia de Avastin, puede inhibir la angiogénesis de manera más efectiva al inhibir varios factores angiogénicos, tales como VEGF-B, VEGF-C, P1GF así como VEGF-A. A través de estos resultados, incluso una dosis baja de Avastin-A22p puede atacar el tumor, lo que
10 reduce los efectos secundarios. Además, se podría esperar que Avastin-A22p llegue no solo a las células cancerosas cercanas a los vasos sanguíneos sino también a los tejidos cancerosos dentro de la masa cancerosa debido a su alta capacidad de penetración y, por lo tanto, inhiba la actividad de varios factores angiogénicos, incluido VEGF-A, secretados en estas células, lo que inhibe la división celular y, por lo tanto, mejora la actividad anticancerígena.

15 En conclusión, tales resultados han verificado que Avastin-A22p puede aplicarse al tratamiento de casos que no responden a Avastin debido a una dependencia relativamente menor de VEGF-A que los otros factores angiogénicos.

20 **Ejemplo 4: Efecto de Avastin-A22p7 sobre la cobertura de pericitos**

En la angiogénesis, el crecimiento vascular ocurre a través de la división celular y el crecimiento a una alta concentración de VEGF, y luego, a medida que la concentración de VEGF disminuye, la concentración de PDGF aumenta y, por lo tanto, se produce la normalización o reconstrucción vascular. La normalización abarca, junto
25 con una disminución en el número y tamaño de los vasos sanguíneos inmaduros, un proceso de reducción de la presión vascular por el líquido intersticial debido a la cobertura de pericitos de los vasos sanguíneos. Cuando la concentración de VEGF se reduce mediante la administración de Avastin, los vasos sanguíneos aumentan la cobertura de pericitos a través de la normalización para debilitar la penetración de un fármaco en el tejido canceroso. Se ha informado que la administración conjunta de Avastin y docetaxel en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas redujo la penetración de fármacos en el cáncer (Arjaans et al., 2013). Este hecho
30 indica que la administración conjunta de Avastin y otro fármaco tiene limitaciones y puede causar resistencia a Avastin.

De acuerdo con el informe de Fan et al., el tratamiento continuo de líneas celulares de cáncer colorrectal primario o metastásico con Avastin durante tres meses resultó en líneas celulares adaptadas a Avastin de ambas líneas celulares, y estas líneas celulares mostraron el mismo crecimiento celular que las líneas celulares existentes, pero han aumentado la migración celular y, por lo tanto, mostraron una metástasis más rápida que las células cancerosas existentes en el xenoinjerto. VEGFR1 y NRP1 se expresaron específicamente en gran medida en
35 tales líneas celulares adaptadas de Avastin, que luego se transformaron en células que secretan varios factores angiogénicos, como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y P1GF, en cantidades más grandes, mostrando resistencia a Avastin (Fan et al., 2011). Por lo tanto, se consideró que el tratamiento con Avastin-A22p o Avastin-TPP11 capaz de unirse a NRP1 para inhibir la señalización de varios factores angiogénicos además de VEGF-A inhibirá eficazmente el crecimiento y la metástasis de las líneas celulares que muestran resistencia a Avastin.

45 Además, sobre la base del informe en el que cuando se administran conjuntamente el anticuerpo anti-NRP1 y un inhibidor de VEGF, la reducción de la cobertura de pericitos de los vasos sanguíneos por el anticuerpo anti-NRP1 puede estar directamente relacionada con la mejora de la eficacia anticancerígena a través del control de la normalización vascular y puede estar involucrado en la superación de la resistencia, los presentes inventores realizaron una prueba de comparación microscópica fluorescente de un cambio de cobertura de pericito en
50 tejidos cancerosos en un modelo de xenoinjerto administrado con Avastin y Avastin-A22p, respectivamente.

Con el fin de investigar la angiogénesis y la capacidad inhibidora de la estabilización vascular de Avastin-A22p en modelos de ratón, se trasplantó SW620 en ratones desnudos, a los que luego se les administró Avastin-A22p y Avastin, respectivamente, y se controló la cobertura de pericitos en el tejido canceroso mediante microscopía
55 de fluorescencia. Cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 250 mm³ después de inyectar células SW620 en ratones desnudos Balb/c, se administraron por vía intravenosa PBS, Avastin y Avastin-A22p a 5 mg/kg para cada ratón, respectivamente. Después de 16 h, se recolectaron los tumores de los ratones, seguido de inmunohistoquímica. El tumor recogido se seccionó a un espesor de 8 µm mediante un procedimiento de sección en parafina. Luego, las células vasculares se tiñeron con, como anticuerpo primario, PECAM1 (Sigma) y anticuerpo secundario conjugado con Alexa[®]488 que reconoce PECAM1, mientras que las células perivasculares se tiñeron con, como anticuerpo primario, anticuerpo NG2 y anticuerpo secundario conjugado con Alexa[®]594 que
60 reconoce el anticuerpo NG2.

Los resultados relacionados se muestran en la Figura 6.

65

Como se muestra en la Figura 6, se confirmó que la cobertura de pericito en relación con los vasos sanguíneos se redujo claramente en el grupo al que se administró Avastin-A22p en lugar del grupo al que se administró Avastin y, por lo tanto, se puede esperar que el aumento del efecto anticancerígeno de Avastin-A22p esté involucrado en la cobertura de pericito. Estos resultados son idénticos a los resultados de las pruebas de animales a los que se les administró conjuntamente el anticuerpo anti-NRP1 desarrollado por Genetech Inc. y Avastin. Se confirmó que los efectos inhibidores de VEGF y NRP1 de Avastin-A22p eran similares a los de los respectivos anticuerpos independientes. Es decir, se puede comprobar que Avastin-A22p es una proteína en concepto de anticuerpo dual específico que inhibe VEGF y NRP1 al mismo tiempo.

Estos resultados pueden sugerir que, a través de la reducción de la cobertura de pericito por A22p, Avastin-A22p puede aumentar el efecto inhibitor de la angiogénesis y superar la resistencia que se produce debido a la administración continua de Avastin.

Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia anticancerígena *in vivo* de Avastin-A22p

Con el fin de investigar la eficacia anticancerígena de Avastin-A22p, se realizó una prueba de comparación con Avastin en modelos de xenoinjerto SW620 de la línea celular de cáncer de colon. La línea celular SW620 es una línea celular tumoral con un 45% de RGI a VEGF, y este experimento con animales se realizó con el fin de evaluar la eficacia anticancerígena contra tumores generales. Se confirmó a través de un pre-experimento que Avastin-A22p mostró una eficacia igual o superior a la de Avastin (resultados no mostrados), y en este experimento, se administró por vía intravenosa Avastin 5 mg/kg a ratones desnudos Balb/c con xenoinjerto de células SW620 y Avastin-A22p 0,5, 1,25, 2,5 mg/kg dos veces por semana durante cinco semanas, respectivamente.

Los resultados relacionados se muestran en la Figura 7.

Como se muestra en la Figura 7, se confirmó que el grupo al que se administró Avastin 5 mg/kg y el grupo al que se administró Avastin-A22p 1,25 mg/kg mostraron un efecto inhibitor similar contra el crecimiento del cáncer. Es decir, se puede apreciar que la proteína de fusión Avastin-A22p puede mostrar una eficacia anticancerígena equivalente incluso con una cuarta parte de la dosis de Avastin.

Se cree que el hecho de que la proteína de fusión Avastin-A22p pueda exhibir una eficacia anticancerígena equivalente incluso con una cuarta parte de la dosis de Avastin se debe al bloqueo de la señalización de NRP1 por parte de A22p, lo que sugiere que los efectos secundarios adversos también pueden reducirse mediante la reducción de la dosis. en las aplicaciones clínicas.

Ejemplo 6: Prueba de confirmación de la inhibición de la migración de líneas celulares resistentes mediante Avastin-A22p

Una de las causas de la resistencia y la capacidad de respuesta a Avastin es que VEGF-A, como objetivo de Avastin, y otros factores de crecimiento, como FGF, el sistema de ligando/receptor de muesca, PIGF y PDGF-BB están involucrados en los mecanismos de señalización. Se sabe que NRP1 afecta la señalización al actuar como co-receptor junto con VEGFR1, VEGFR3, C-met y PDGFR, así como la unión de VEGFR2 con VEGF-A. Los presentes inventores investigaron si A22p fusionado con Avastin inhibe la unión a NRP1 de manera competitiva con otros factores angiogénicos que se unen a NRP1.

Las líneas celulares HCT116/bev (proporcionadas por L M Ellis, MD anderson), que habían obtenido resistencia a Avastin mediante el tratamiento continuo de células HCT116 con Avastin, se trataron con Avastin y Avastin-A22p para investigar la capacidad inhibitor de la migración de las mismas, respectivamente. En comparación con sus células parentales HCT116, HCT116/bev tiene mayores niveles de expresión de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y P1GF, con una mejor capacidad de migración celular y metástasis (Fan et al., 2011). Por lo tanto, si Avastin-A22p inhibe la migración de células HCT116/bev, se puede confirmar la posibilidad de que Avastin-A22p supere la resistencia a Avastin y aumente su eficacia. Un procedimiento de ensayo específico fue el siguiente.

Cada una de las células HCT116 y HCT116/bev se sembró a 4×10^5 células/pocillo en la placa de 6 pocillos y se incubaron durante 2 días. A partir de entonces, se hizo un blanco en forma de cruz en cada pocillo. Se retiró el medio y se añadieron 50 ng/ml de VEGF y se dispensó en medio MEM-alfa suplementado con FBS al 1%. Avastin y Avastin-A22p se trataron cada uno para convertirse en 1 μ M. El blanco se fotografió inmediatamente después del tratamiento con el fármaco (0 h), y la misma posición se fotografió a intervalos de 2 h a partir de las 48 h. Las capacidades inhibitoras de la migración celular de Avastin-A22p y Avastin se compararon calculando la anchura del blanco vacío de los resultados de la fotografía mediante el programa Image J y cuantificando inversamente el grado de migración celular del mismo.

Los resultados se muestran en la Figura 8.

Como se muestra en la Figura 8, la migración de células HCT116 aumentó del 51,7% al 67,4% con VEGF, mientras que se redujo al mismo nivel de 61,2% y 61,7% para el tratamiento con Avastin y Avastin-A22p, respectivamente. Por el contrario, en cuanto a las células HCT116/bev, la migración de células HCT116/bev fue del 65,3% incluso en el grupo tratado sin VEGF, lo que indica que las células HCT116/bev fueron más agresivas que las células HCT116, mientras que la migración de HCT116/bev las células se incrementó al 72,9% por medio del tratamiento con VEGF. Se observó que dicha migración fue del 74,1% con el tratamiento con Avastin, lo que indicó que no hubo diferencia en la migración, mientras que dicha migración fue del 66,2% con el tratamiento con Avastin-A22p, lo que indicó que la migración se suprimió al mismo nivel que en el grupo tratado sin VEGF.

Los resultados de que las líneas celulares adaptadas con Avastin, HCT116/bev, mostraron una mayor migración en comparación con sus células originales, HCT116, independientemente de la adición de VEGF-A, indicaron que la migración de HCT116/bev aumentó dependiendo no solo de VEGF-A sino también otros factores de crecimiento. El tratamiento con Avastin no suprimió la migración, mientras que el tratamiento con Avastin-A22p redujo la migración al mismo nivel que en el tratamiento sin VEGF-A. Esto significa que Avastin-A22p inhibe las señales de otros factores de crecimiento además de VEGF-A, lo que indica que Avastin-A22p puede contribuir a superar la resistencia a Avastin. Además, este resultado sugiere que Avastin-A22p puede promover efectos anticancerígenos y reducir la posibilidad de aparición de resistencia al inhibir no solo la señalización de VEGF-A sino también otros procedimientos de señalización.

Ejemplo 7: Evaluación de la inhibición de la señalización de PDGF mediante Avastin-A22p

NRP1 actúa como un co-receptor para el receptor de PDGF para mejorar la señalización por PDGF. Se sabe que la unión de PDGF a un receptor del mismo en células cancerosas aumenta la fosforilación de la proteína p130cas y promueve la migración e invasión de células cancerosas. Los presentes inventores investigaron si A22p fusionado con Avastin inhibe la señalización de PDGF al unirse a NRP1.

Las células U87MG se trataron con 25 µg/ml de Avastin o Avastin-A22p y, después de 30 min, se trataron con 50 ng/ml de PDGF. Después de 5 min, se extrajeron las proteínas y luego se llevó a cabo la comparación de la fosforilación de p130cas usando el anticuerpo anti-fosfo-p130 y el anticuerpo anti-p130cas.

Los resultados se muestran en la Figura 9

Como se muestra en la Figura 9, se verificó que el PDGF aumentó la fosforilación de p130cas, y el tratamiento con Avastin no dio como resultado ninguna diferencia, pero la fosforilación en el grupo de tratamiento con Avastin-A22p se suprimió al nivel del vehículo.

Este resultado significa que Avastin-A22p elimina VEGF-A y también suprime la señalización de PDGF al unirse a NRP1, y que Avastin-A22p puede aumentar los efectos anticancerígenos al suprimir la migración y la invasión de PDGF.

Ejemplo 8: Preparación de la proteína de fusión del péptido de penetración tisular (TPP) variante de Avastin

Con el fin de investigar si una proteína de fusión, en la que un péptido de penetración tisular (TPP) se fusionó con una variante que contenía una secuencia modificada con frecuencia en otros medicamentos de anticuerpos mientras conservaba sus características, se intentó que un péptido de penetración tisular (TPP) capaz de unirse tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 se fusionó con el extremo C del péptido variante de Avastin (en lo sucesivo, denominado "Avastin(V)") con modificaciones de los aminoácidos 362 y 364 en el aminoácido de Avastin secuencia.

Específicamente, se preparó una proteína de fusión en la que TPP (A22p) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 con el extremo C de Avastin (V) y una línea celular que produce la proteína de fusión, respectivamente. Los genes marcadores de selección DHFR se insertaron en vectores pcADN3.1(-) y las cadenas pesada y ligera de Avastin(V)-A22p se clonaron mediante las enzimas de restricción NotI y BamHI. Un plásmido que codifica la proteína formada por la fusión de cada una de las regiones constantes pesadas del anticuerpo construido y un péptido que se une a NRP1 y un plásmido que codifica una proteína de cadena ligera se expresaron para la proteína en células CHO DG44 usando electroporesis Neon™. En un matraz T25, se inocularon 3×10^6 células transfectadas con plásmido y se incubaron a 37 °C. Las células estables se aseguraron utilizando el marcador de selección y luego se cultivaron en estado flotante en SFM4CHO (Hyclone) sin suero durante 7 días en condiciones de 100 rpm, 37 °C, pH 7,2, DO₂ al 50% en un biorreactor. El sobrenadante se separó de las células mediante centrifugación y se esterilizó mediante un filtro de 0,22 µm.

Se recogió el cultivo de Avastin(V)-A22p y las proteínas se purificaron respectivamente con referencia a un protocolo estándar. Para la columna de purificación, la resina de proteína A (Resina MabselectSure, GE Healthcare) se empaquetó a 20 ml en la columna XK16/20 (Resina MabselectSure, GE Healthcare), a la que se

aplicó una velocidad lineal de 200 cm/h. Se aplicó 1 l de anticuerpo a la columna de proteína A y la columna se lavó con un volumen de columna de 15 veces de PBS (pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM). El anticuerpo se eluyó con 100 ml de tampón de glicina 0,1 M a pH 3,0. Las proteínas se recogieron entre 10 mAU y 10 mAU en la absorbancia UV a 280 nm, y 60 ml de las proteínas se neutralizaron a pH 7,0 usando 0,7 ml de tampón Tris 1 M. Las fracciones de anticuerpos se filtraron con un filtro de 0,2 µm (Milipore) y luego se concentraron usando un concentrador amicon (30 MWCO) (Milipore) a 3500 rpm durante 10 min, seguido de intercambio con tampón PBS (pH 7,4) que contenía glicerol al 10%. La proteína de fusión purificada formada por la fusión de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo purificada y el péptido seleccionado que se une específicamente a NRP1 se analizó en SDS-PAGE en condiciones de reducción y no reducción.

Las proteínas respectivas se purificaron de los cultivos recogidos de las líneas celulares que expresaban Avastin(V)-A22p y Avastin-A22p, y se aislaron mediante SDS-PAGE. La Figura 10 confirmó que Avastin(V)-A22p formó con éxito el anticuerpo y tiene un peso molecular similar al de Avastin-A22p.

Con el fin de investigar la pureza de la proteína purificada Avastin(V)-A22p, se realizó un ensayo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó Agilent 1200 (Agilent) y se utilizó una columna de exclusión por tamaño (Biosuite 250, Waters).

En concreto, se utilizó como fase móvil una solución tampón (pH 6,2) que contenía fosfato potásico 0,2 M y cloruro potásico 0,25 M, y se dejó fluir hacia abajo a un caudal de 0,35 ml/min durante 20 min. Se comprobó el tamaño de la proteína según el tiempo de retención, y la pureza de la misma según el área y la altura.

En la Figura 11, la pureza de Avastin(V)-A22p se analizó mediante SE-HPLC. Se verificó que la pureza de Avastin(V)-A22p era del 97% o superior (Figura 11A), que era la misma que la pureza de Avastin-A22p (Figura 11B).

Los presentes inventores, en lo sucesivo, prepararon una proteína de fusión Avastin(V)-A22p en la que A22p como un TPP que tenía la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 se fusionó con Avastin(V) y evaluaron su actividad.

Ejemplo 9: Capacidad de unión de la proteína de fusión Avastin(V)-péptido de penetración tisular (TPP) a NRP1 y VEGF

Con el fin de evaluar si el extremo N de la proteína de fusión Avastin(V)-A22p preparada en el Ejemplo 8 puede unirse a VEGF de la misma manera que Avastin, mientras que su extremo C puede unirse a NRP1 para bloquear así doblemente la señalización asociada, se evaluó la unión de Avastin(V)-A22p con NRP1 y VEGF respectivamente.

La capacidad de unión del Avastin(V)-A22p purificado al dominio Neuropilina 1-b1b2 se investigó en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Avastin-A22p se utilizó como control positivo. La molécula diana del dominio Neuropilina 1-b1b2 (273-586) se hizo reaccionar a 1 µg por pocillo en la placa Maxibinding Immuno de 96 pocillos (SPL Life sciences., Corea) durante 2 h a 37 °C, y luego se lavó con 0,1% PBST (Tween20 al 0,1%, pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) durante 1 min tres veces. Después de la reacción con PBST al 0,1% que contenía leche desnatada al 5% durante 1 h, el producto de reacción se lavó tres veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Avastin(V)-A22p, como grupos experimentales, se diluyó con PBST al 0,1% a 50 nM, 25 nM y 12,5 nM, y luego las soluciones se trataron a 37 °C durante 1 h para cada concentración diferente y se lavaron con 0,1% PBST durante 1 min tres veces. El anticuerpo anti-cadena ligera kappa conjugado con HRP (mAb anti-cadena ligera kappa humana conjugado con peroxidasa de rábano picante, SIGMA-ALDRICH Co., EE. UU.) se diluyó 100.000 veces con PBST al 0,1 % que contenía un 5% de leche desnatada, seguido de tratamiento a 37 °C durante 30 min. A continuación, el producto de reacción se lavó cinco veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Para el desarrollo del color, el producto resultante se trató con el sustrato colorimétrico TMB HRP (Surmodics co., EE. UU.), seguido de la reacción a temperatura ambiente durante 10 min, el tratamiento con el mismo volumen de HCl 1 N (tampón de parada) y luego medición de absorbancia a 450 nm. La capacidad de unión del Avastin(V)-A22p expresado y purificado al dominio de Neuropilina 1-b1b2 se confirmó a través de los resultados de ELISA obtenidos.

La capacidad de unión del Avastin(V)-A22p purificado al VEGF 165 humano recombinante (R&D Systems co. China) se investigó en ELISA. Avastin-A22p se utilizó como control positivo. La molécula diana VEGF 165 humano recombinante se hizo reaccionar a 0,2 µg por pocillo en la placa Maxibinding Immuno de 96 pocillos durante 2 h a 37 °C y luego se lavó con 0,1 PBST durante 1 min tres veces. Después de la reacción con PBST al 0,1% que contenía leche desnatada al 5% durante 1 h, el producto de reacción se lavó tres veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Avastin(V)-A22p, como grupos experimentales, se diluyó con PBST al 0,1% a 6,25 nM, 3,12 nM y 1,56 nM, y luego las soluciones se trataron a 37 °C durante 1 h para cada concentración diferente y se lavaron con 0,1% PBST durante 1 min tres veces. El anticuerpo anti-cadena ligera kappa conjugado con HRP se

diluyó 100.000 veces con leche desnatada al 5% que contenía PBST al 0,1%, seguido de tratamiento a 37 °C durante 30 min. A continuación, el producto de reacción se lavó cinco veces con PBST al 0,1% durante 1 min. Para el desarrollo del color, el producto resultante se trató con el sustrato colorimétrico TMB HRP, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 10 min, tratamiento con el mismo volumen de HCl 1 N y luego medición de absorbancia a 450 nm. La capacidad de unión del Avastin(V)-A22p expresado y purificado al VEGF 165 humano recombinante se confirmó a través de los resultados de ELISA obtenidos.

Los resultados se muestran en la Figura 12

Como se muestra en la Figura 12, se confirmó que Avastin(V)-A22p se unía a NRP1 al mismo nivel que Avastin-A22p utilizado como control (Figura 12A), y también se unía a VEGF al mismo nivel que Avastin-A22p (Figura 12B).

Aplicabilidad industrial

La composición farmacéutica para su uso como se define en la reivindicación 1 puede mejorar la penetración tumoral del agente anti-VEGF y ejercer un efecto dirigido contra el cáncer, exhibiendo así un excelente efecto terapéutico incluso con una dosis pequeña y reduciendo así los efectos secundarios del agente anti-VEGF, al mismo tiempo que exhibe un excelente efecto terapéutico incluso sobre el cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis que tiene resistencia al agente anti-VEGF al unirse a un factor de crecimiento de la angiogénesis y NRP1 al mismo tiempo. Por lo tanto, la presente invención tiene una gran aplicabilidad industrial.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento del cáncer o de una enfermedad relacionada con la angiogénesis o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, comprendiendo la composición, como principio activo, una proteína de fusión obtenida por fusión de un péptido de penetración tumoral y un agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) seleccionado de un grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030, y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos,
- en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido de penetración tumoral y el factor de crecimiento celular endotelial vascular están fusionados a través de un enlazador.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende una cadena pesada representada por cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12, y una cadena ligera representada por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cáncer o la enfermedad relacionada con la angiogénesis es resistente o no responde al agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF).
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad relacionada con la angiogénesis se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, inflamación, endometriosis y angioma.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer peritoneal, cáncer de piel, melanoma de piel o intraocular, cáncer de recto, cáncer perianal, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de glándulas endocrinas, cáncer de paratiroides, cáncer suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, leucemia crónica o aguda, linfoma linfocítico, hepatoma, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, adenoma hepatocelular, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o de útero, tumor de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, y cáncer de cabeza o cuello.
8. Una proteína de fusión que se forma mediante la fusión de un péptido de penetración tumoral y un factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer o una enfermedad relacionada con la angiogénesis, o para su uso en la inhibición de la metástasis del cáncer, en la que el agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF) se selecciona del grupo que consiste en ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, conbercept, r84, CT01, DOM15-10-11, DOM15-26-593, PRS-050, CT-322, ESBA903, EPI-0030 y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los mismos,
- en el que el péptido de penetración tumoral se une tanto a la neuropilina 1 (NRP1) como a la neuropilina 2 (NRP2) y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o el péptido de penetración tumoral se une específicamente solo a la neuropilina 1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.
9. La proteína de fusión para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el cáncer o la enfermedad relacionada con la angiogénesis es resistente o no responde al agente anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular (anti-VEGF).

FIG. 1

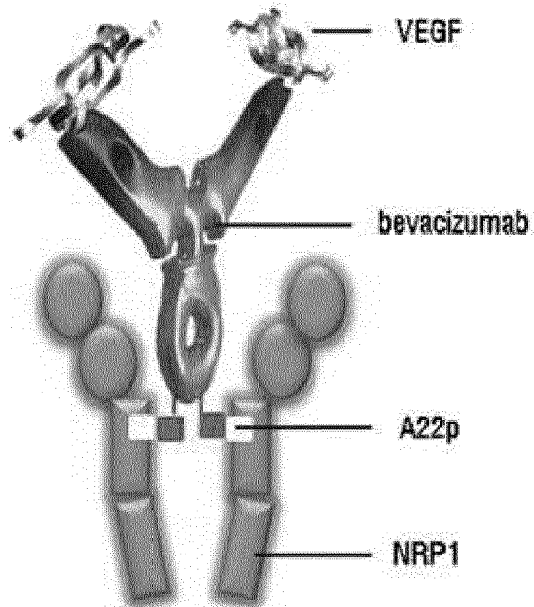


FIG. 2

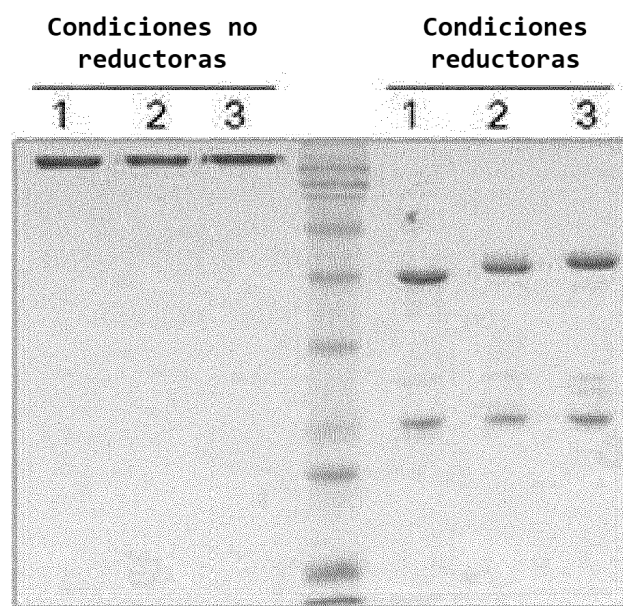


FIG. 3

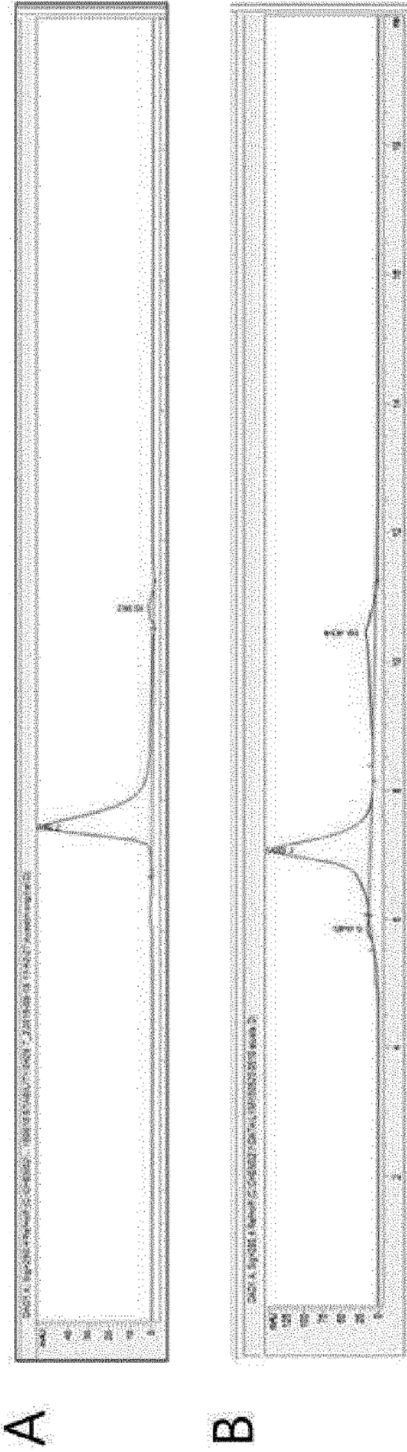


FIG. 4

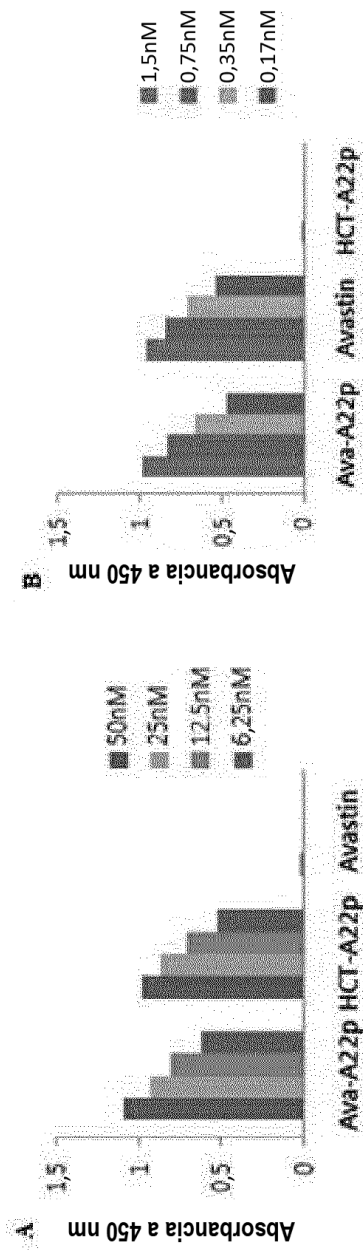


FIG. 5

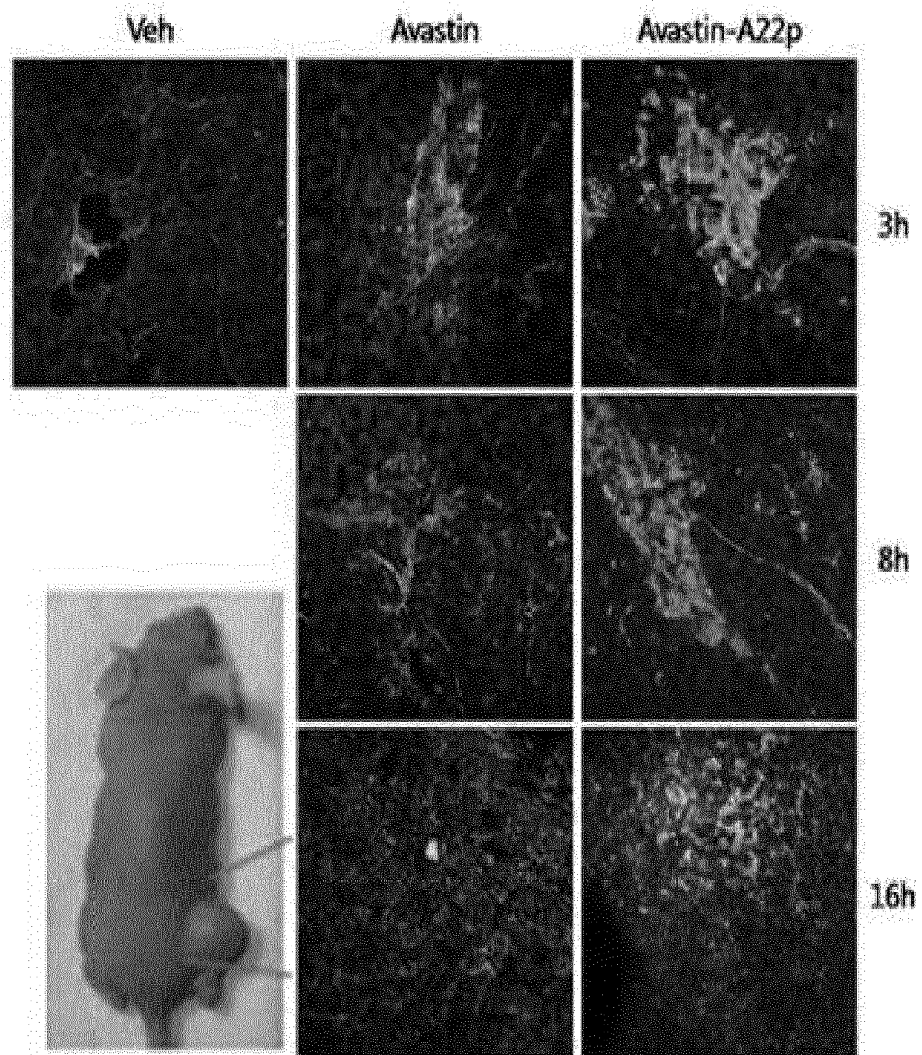


FIG. 6

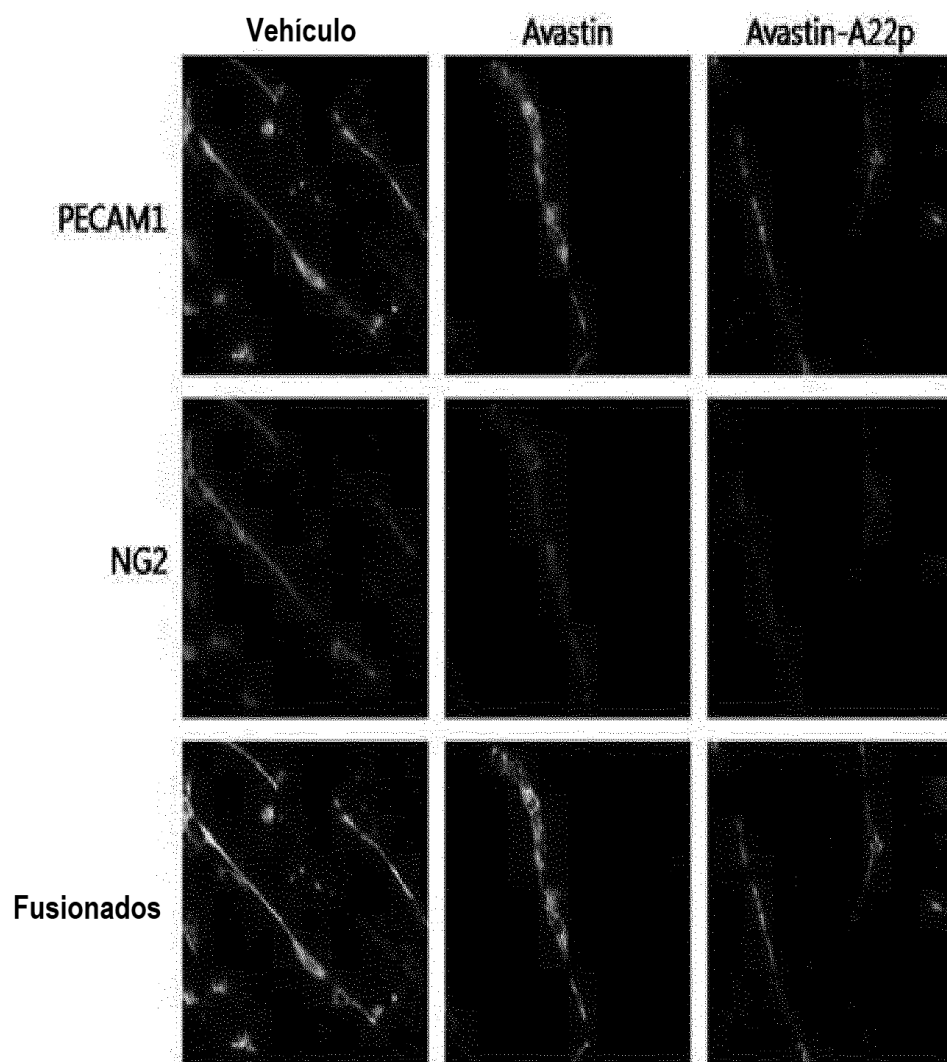


FIG. 7

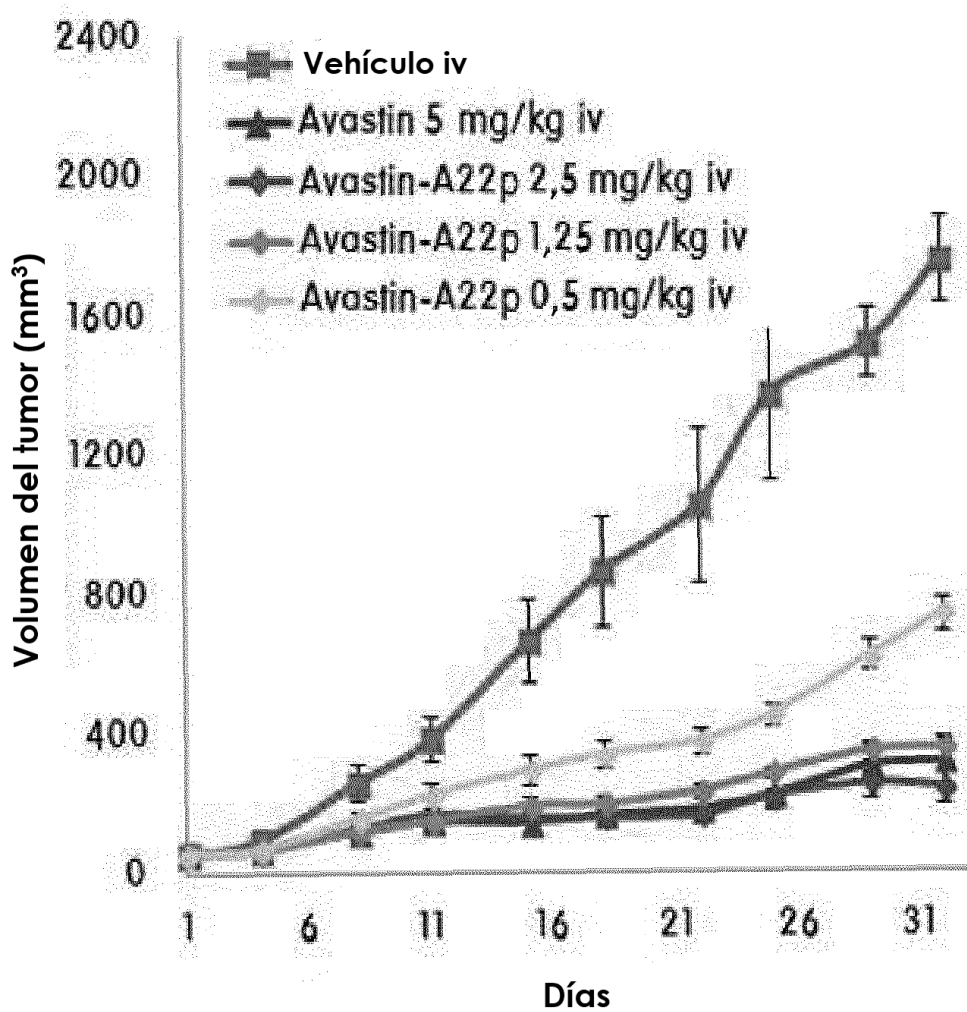


FIG. 8

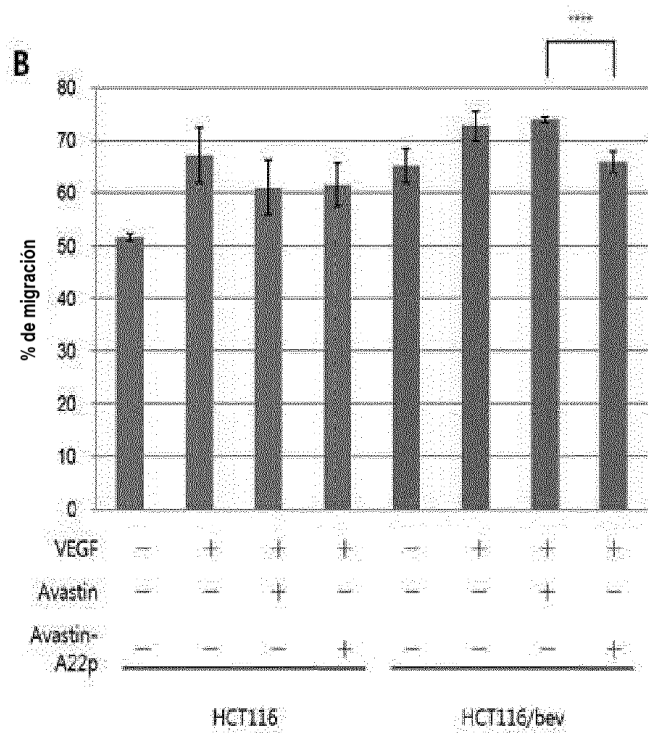
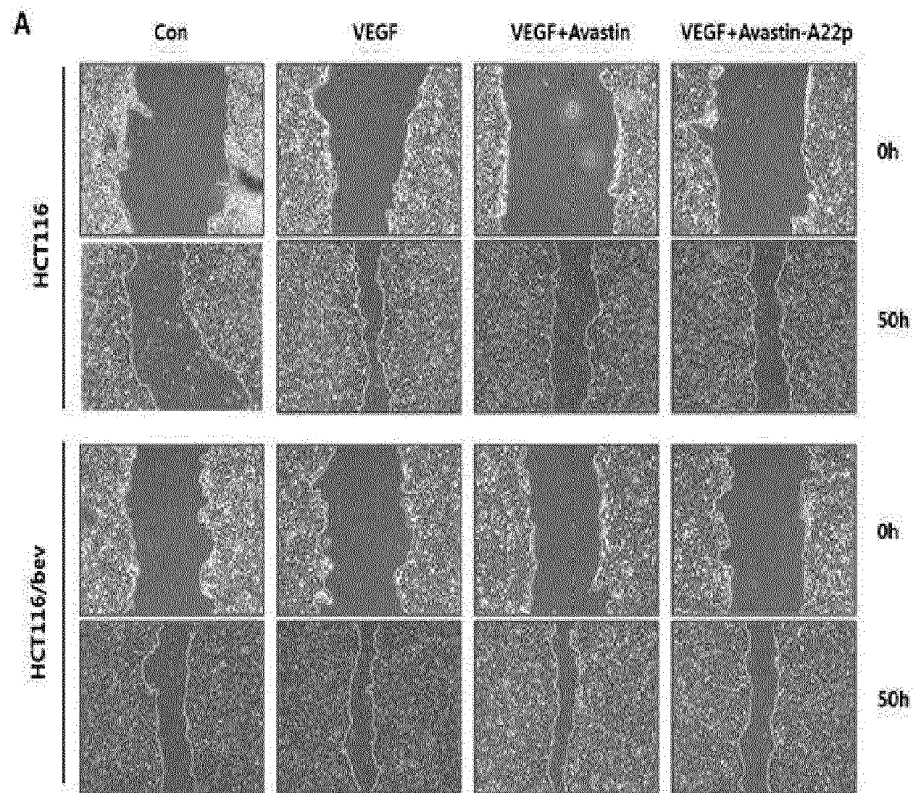
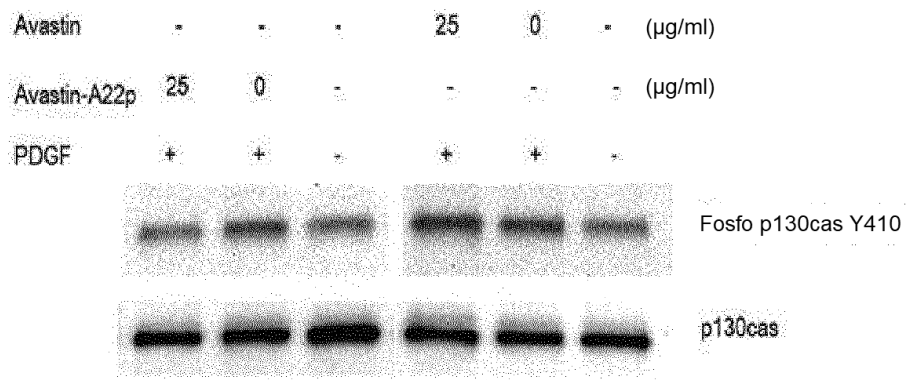


FIG. 9

A



B

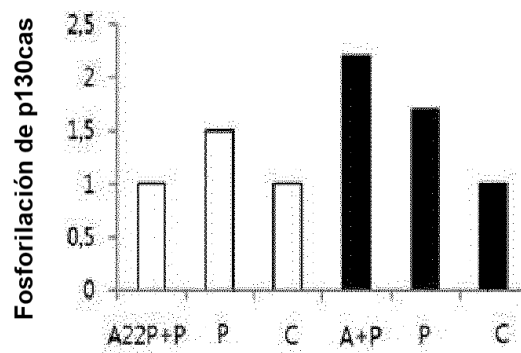


FIG. 10

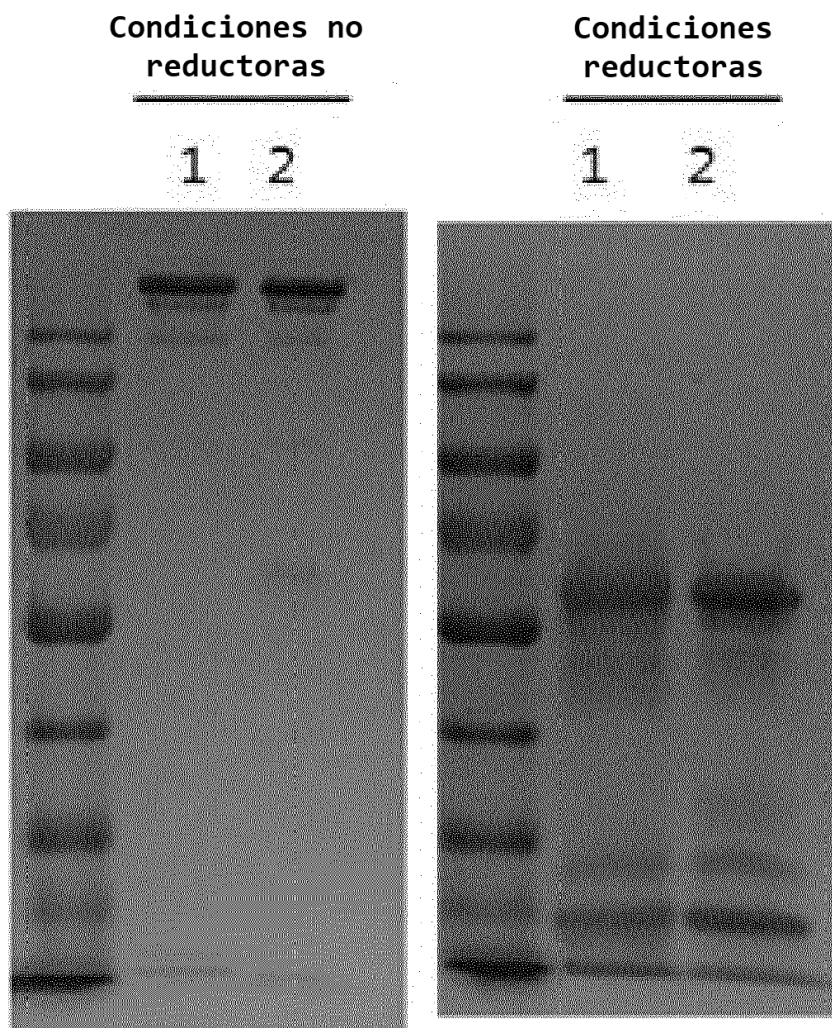


FIG. 11

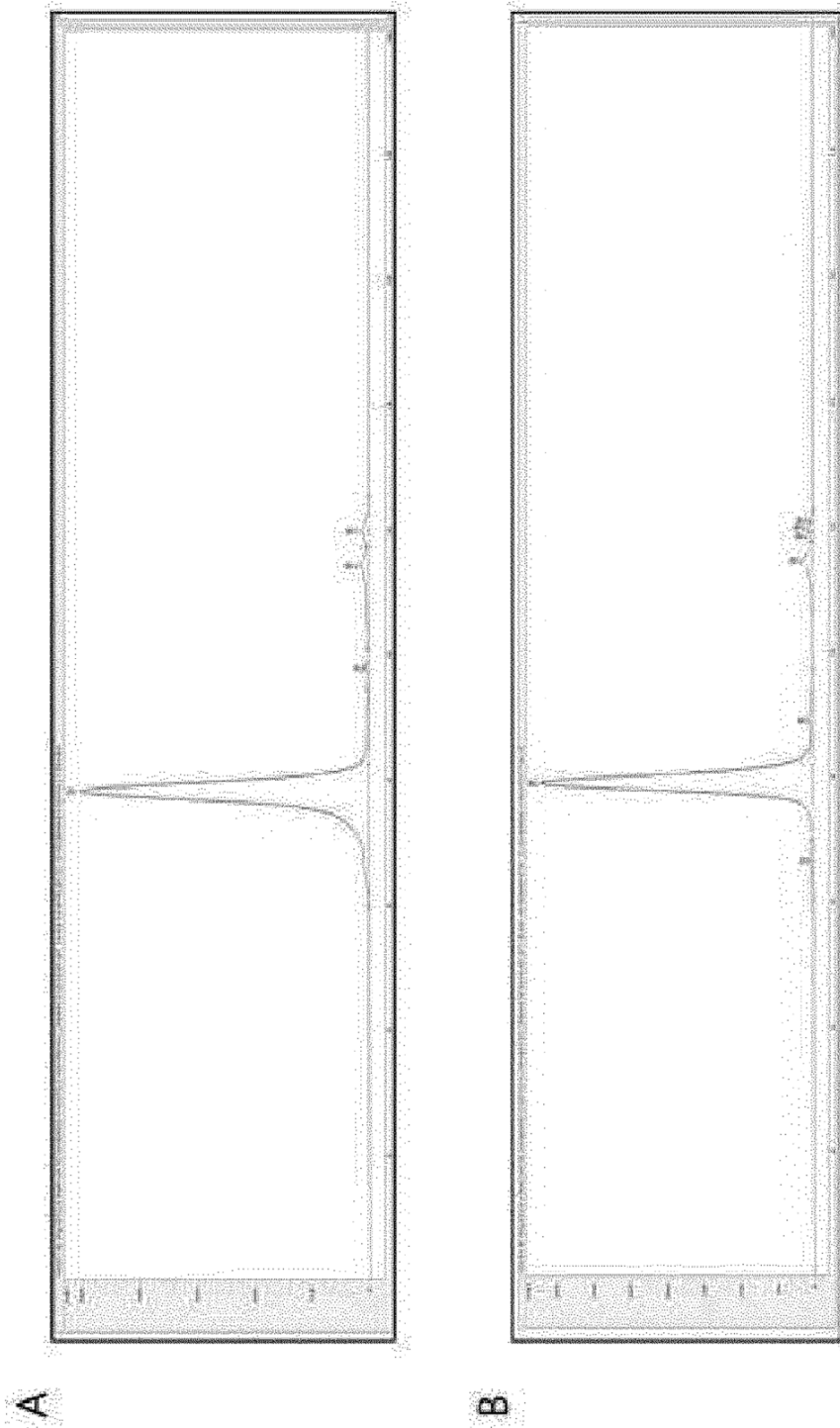


FIG. 12

