



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0924535-9 B1



(22) Data do Depósito: 22/07/2009

(45) Data de Concessão: 20/07/2021

(54) Título: ANTICORPO DIRECIONADO A DOIS ALVOS E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, DNA, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 19/00.

(30) Prioridade Unionista: 20/05/2009 KR 10-2009-0044032.

(73) Titular(es): PHARMABCINE INC..

(72) Inventor(es): JIN SAN YOO; WEON SUP LEE; SUNG WOO KIM; SANG RYEOL SHIM.

(86) Pedido PCT: PCT KR2009004084 de 22/07/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/134666 de 25/11/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/11/2011

(57) Resumo: ANTICORPO DE DUPLO DIRECIONAMENTO DE NOVA FORMA, E USO DO MESMO. A presente invenção refere-se a um anticorpo de dupla posicionamento de uma nova forma que possui um ligante solúvel em água fundido com o N-Terminal de uma cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo; um DNA uma célula hospedeira que é transformada com o vetor de expressão recombinante; um método para preparar o anticorpo de duplo posicionamento ao cultivar a célula hospedeira; e uma composição farmacêutica que inclui o anticorpo de duplo posicionamento.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
“ANTICORPO DIRECIONADO A DOIS ALVOS E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, DNA, VETOR DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”.

Campo da Técnica

[0001] A presente invenção refere-se a um anticorpo direcionado a dois alvos de uma nova forma que possui um ligante solúvel em água fundido com o N-Terminal de uma cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo, um DNA que codifica o anticorpo direcionado a dois alvos, um vetor de expressão recombinante que contém o DNA, uma célula hospedeira que é transformada com o vetor de expressão recombinante, um método para produzir o anticorpo direcionado a dois alvos ao cultivar a célula hospedeira, e uma composição farmacêutica que inclui o anticorpo direcionado a dois alvos.

Antecedentes da Técnica

[0002] Angiogênese refere-se a um mecanismo por meio do qual novos vasos sanguíneos são formados a partir dos vasos sanguíneos pré-existentes através do crescimento, diferenciação e migração de células endoteliais. Sabe-se que a angiogênese exerce uma função importante no processo de crescimento normal que inclui a cicatrização de feridas e o ciclo menstrual de uma mulher (Risau, Nature, 386: 671, 1997) e a angiogênese anormalmente excessiva exerce uma função importante no crescimento e metástase de tumor e o ataque de doenças como degeneração macular relacionada à idade (ARMD), retinopatia diabética, psoríase, artrite reumatoide e inflamação crônica (Carmeliet e Jain, Nature, 407: 249, 2000).

[0003] Em 1971, o Dr. J. Folkman propôs uma hipótese que o crescimento e metástase de tumor é angiogênese-dependente, e assim a estratégia terapêutica que se concentra na antiangiogênese pode envolver um novo agente terapêutico para câncer sólido. Portanto, vem

aumentando o interesse de muitos pesquisadores em pesquisas excessivas associadas à inibição do mecanismo de angiogênese (Ferrara e Kerbel, *Nature*, 435: 967, 2005). O padrão de avanço de angiogênese é determinado pelo equilíbrio geral entre fatores indutores da angiogênese e fatores inibidores da angiogênese e ocorre através de processos complexos e sequenciais de múltiplas etapas. Quando se refere a tal processo, primeiramente, vários fatores indutores de angiogênese que incluem um fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) secretado de tecidos com tumor ou feridas estão ligados a seus receptores correspondentes na periferia de células endoteliais vasculares pré-existentes para ativar as células endoteliais vasculares, aumentando assim a permeabilidade das células endoteliais vasculares. Ademais, as proteínaases como uma metaloproteinase de matriz (MMP) são secretadas para digerir a membrana basal e a matriz extracelular em torno das células endoteliais vasculares, de modo que as células endoteliais vasculares escapem do vaso capilar pré-existente e migrem/se proliferem em direção aos tecidos que secretam o fator indutor de angiogênese. As células endoteliais vasculares de migração e proliferação formam uma estrutura tubular no vaso sanguíneo, e, por fim, um vaso sanguíneo estável e maduro é formado como um pericito que é um suporte estrutural das células endoteliais vasculares que flui para dentro da estrutura tubular. Nesse caso, sabe-se que a angiopoietina 1 (Ang1) secretada das células endoteliais vasculares exerce uma função importante no influxo de pericito e na estabilização de vasos sanguíneos mediante a ligação a seu receptor, Tie-2 (Suri et al., *Célula*, 87:1171, 1996). Entretanto, a angiopoietina 2 (Ang2) que é conhecida por inibir a interação de Ang1 e Tie-2 mostra afinidade similar com Tie-2 comparado com Ang1, e, assim, Ang2 pode servir para inibir de maneira competitiva um processo de fosforilação induzido por Ang1 (Maisonpierre et al., *Science*, 277:55, 1997). Entretanto, foi relatado que a Ang2 funciona para

induzir a fosforilação de Tie-2 dependendo do formato de células e do método experimental (Kim et al., *Oncogene*, 19:4549, 2000). Também, foi relatado que o vaso sanguíneo se torna instável e as células endoteliais vasculares se tornam sensíveis a estímulos como VEGF ao inibir a interação entre a célula endotelial vascular e o pericito no estágio inicial de angiogênese (Klagsbrun e Moses, *Chem. Biol.*, 6:R217, 1999; Veikkola e Alitalo, *Semin Cancer Biol.*, 9:211, 1999; Carmeliet e Jain, *Nature*, 407:249, 2000). Em particular, a Ang1 é expressa de maneira relativamente ampla em tecidos normais (Maisonpierre et al., *Science*, 277:55, 1997), porém é expressa de forma insatisfatória em tecidos tumorais (Hayes et al., *Br. J. Cancer*, 83:1154, 2000). Por outro lado, a partir do fato de que a Ang2 é superexpressa em tecidos cancerígenos que possuem um alto potencial angiogênico ou tecidos normais, como a placenta, útero e ovário, cuja remodelagem do vaso sanguíneo ocorre ativamente (Kong et al., *Cancer Res.*, 61:6248, 2001; Ahmad et al., *Cancer*, 92:1138, 2001), pode-se presumir que o início de angiogênese em tumor ocorre à medida que a Ang2 está presente em um teor maior do que a Ang1. Portanto, supõe-se que a Ang2 sirva como um agonista em um mecanismo de sinalização de Tie-2. Em suma, visto que os mecanismos de sinalização de angiopoietina e Tie-2 não são claramente identificados, estudos adicionais são exigidos para identificar os mecanismos de sinalização. Entretanto, a Ang1 e a Ang2 são consideradas para exercer funções diferentes e importantes em angiogênese.

[0004] A angiopoietina inclui um domínio de N-Terminal (domínio N) que consiste em aproximadamente 50 aminoácidos, um domínio "coiled coil" (domínio C) que consiste em 215 aminoácidos, e um domínio similar a fibrinogênio (domínio F) que consiste em aproximadamente 215 aminoácidos. Entre esses, os domínios N e C estão associados à polimerização de angiopoietina, e o domínio F está associado à ligação

de um receptor Tie-2 (Davis et al., Nat. Struct. Biol., 10:38, 2003). A fosforilação exigida para induzir os sinais de Tie-2 é realizada mediante a dimerização do receptor conforme outros receptores tirosina quinase. A partir do fato de que a angiopoietina deve ser multimerizada para esse propósito (Procopio et al., J. Biol. Chem., 274:30196, 1999; Schlessinger, Cell, 103:211, 2000), sugere-se que esses ligantes possam ser usados como um posicionamento para o desenvolvimento de um novo fármaco utilizando a inibição de angiogênese. Em particular, Davis et al. discute que um módulo mínimo de angiopoietina para a fosforilação de Tie-2 é um tetrâmero como medido utilizando uma técnica de engenharia genética e pode ser usado como um antagonista quando o módulo for composto de dímeros (Davis et al., Nat. Struct. Biol., 10:38, 2003). Em outro estudo, foi relatado que uma variante dimérica de Ang1 não realiza de maneira eficaz a sinalização de Tie-2 (Cho et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101:5547, 2004). Ou seja, embora não seja relatado que a Ang1 serve como um antagonista, a inibição de sinalização de Tie-2 ao modificar o padrão oligomérico dessa molécula indica que uma estratégia para impedir a multimerização de angiopoietina pode ser usada para atrapalhar o mecanismo de sinalização de Tie-2. De acordo com a estrutura de ligação relatada de angiopoietina e Tie-2, pode ser observado que um sítio de ligação de Tie-2 está presente em angiopoietina e a estrutura de ligação entre Ang1 e Tie-2 é similar àquela entre Ang2 e Tie-2 (Barton W.A. et al., Nat. Struct. Biol., 13:524, 2006). Portanto, os presentes pesquisadores tentaram inibir de maneira eficaz a angiogênese ao construir um anticorpo direcionado a dois alvos em que um sítio de ligação de Tie-2 à angiopoietina, particularmente Ang2 na presente invenção, é fundido com um anticorpo pré-existente.

[0005] Entretanto, como outro posicionamento para inibir a angiogênese, foi dada atenção a um mecanismo de sinalização de

VEGF/VEGFR na presente invenção. O VEGF que é conhecido por possuir um efeito significativo sobre a maioria das etapas de um processo angiogênico é amplamente secretado a partir de um sítio de hipoxia de uma região tumoral. Em 1989, o VEGF foi identificado pelo Dr. N. Ferrara, et al. de Genentech através do isolamento e purificação de proteína e clonagem de cDNA (Leung et al., Science, 246:1306, 1989). O VEGF denominado VEGF-A é conhecido por possuir quatro isotipos (VEGF121, VEGF165, VEGF189 e VEGF206). Entre esses, foi relatado que o VEGF165 é abundante em todos os tecidos humanos exceto para a placenta (Tisher et al., J. Biol. Chem., 266:11947, 1991). Sabe-se que VEGF se liga a seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 com uma afinidade muito alta, porém induz os mecanismos associados à angiogênese como a proliferação e migração de células endoteliais vasculares ao transduzir seus sinais através de VEGFR-2. Por esse motivo, VEGF e VEGFR foram principalmente posicionados para inibir os mecanismos de angiogênese induzidos por VEGF, e muitos artigos que lidam com esses conteúdos foram relatados (Ellis e Hicklin, Nature Rev. Cancer, 8:579, 2008; Youssoufian et al., Clin. Cancer Res., 13:5544s, 2007). Por exemplo, Avastina de Genentech é um VEGF-A de posicionamento de anticorpo humanizado (Ferrara et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 333:328, 2005) e foi aprovado pela U.S. Food e Drug Administration (FDA) para câncer de cólon metastático em 2004, câncer pulmonar de células não pequenas em 2006 e câncer de mama metastático negativo Her-2 em 2008, respectivamente, e entraram no mercado. Recentemente, testes clínicos extensivos em vários tumores sólidos foram realizados para aumentar as indicações. Ademais, Lucentis comercialmente disponível a partir da mesma empresa é um anticorpo produzido ao digerir apenas um fragmento Fab de Avastina para promover sua permeabilidade quando Lucentis for injetado na retina para inibir a angiogênese excessiva sob a mácula que é uma

condição principal da degeneração macular senil (Eter et al., Biodrgus, 20:167, 2006) e foi aprovado em 2006 pela USA FDA como um agente terapêutico para tratar degeneração macular relacionada à idade úmida (ARMD úmida). Outro VEGF de posicionamento de anticorpo terapêutico é VEGF-trap de Regeneron (Holash et al., PNAS, 99:11393, 2002). Esse é um "receptor decoy" solúvel em água obtido ao fundir o segundo domínio de imunoglobulina de VEGFR-1 e o terceiro domínio de imunoglobulina de VEGFR-2 com Fc humano e não foi aprovado pela USA FDA, e seus ensaios de fase III para câncer de mama metastático, câncer pulmonar metastático, câncer de cólon metastático e câncer de próstata refratário hormonal estão agora em andamento.

[0006] Os anticorpos de inibição de angiogênese que posicionam um VEGFR-2 de receptor VEGF incluem IMC-1121B (EP 1916001A2) de Imclone, CDP-791 (PCT/GB02/04619) de UCB, e TTAC-0001 (PCT/KR07/003077) desenvolvidos pelos presentes pesquisadores. IMC-1121B é um anticorpo monoclonal examinado a partir da biblioteca de Fab humana completa, seus ensaios de fase III para câncer de mama metastático estão agora em andamento, e seus ensaios de fase III para câncer gástrico são programados para serem realizados em 2009. CDP-791 de UCB é um anticorpo humanizado, e seus ensaios de fase II para câncer pulmonar de células não pequenas sob a forma de Di-Fab PEGuilado estão agora em andamento. Visto que esse anticorpo não contém um domínio Fc, a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo ou a citotoxicidade dependente de complemento não pode ser esperada. Por fim, TTAC-0001 desenvolvido pelos presentes pesquisadores e estudado em um estágio pré-clínico é um anticorpo monoclonal examinado a partir da biblioteca de ScFv humana completa. Esse é apenas um anticorpo que mostra reatividade com flk-1 derivado de camundongo ou rato (homólogo de VEGFR-2) enquanto posiciona VEGFR-2 e é uma das características mais importantes que se

diferenciam do IMC-1121B de Imclone (PCT/KR07/003077). Em particular, a reatividade cruzada de espécies cruzadas de TTAC-0001 permite a pesquisa sobre um modelo de doença animal, que ajuda a desenvolver um agente anticâncer para o tratamento de tumores específicos no futuro e para concluir a pesquisa relacionada mais facilmente.

[0007] Com isso, a pesquisa voltada para o VEGF e VEGFR-2 avançou muito nos últimos 5 anos, e vários agentes terapêuticos foram desenvolvidos através do mercado e estudos clínicos. Além de desenvolver um anticorpo terapêutico utilizando a inibição de angiogênese, muitos agentes terapêuticos de anticorpo que utilizam um único posicionamento para cada doença foram aprovados pela FDA e entraram no mercado. Por exemplo, os principais agentes terapêuticos de anticorpo que levaram o mercado de anticorpos monoclonais para o mundo incluem Eribitux (Imclone) que posiciona um receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e foi vendido como um agente terapêutico para tratar câncer de cólon metastático, Herceptin (Genentech) que posiciona Her-2/neu e foi vendido como um agente terapêutico para tratar câncer de mama metastático, e Rituxan TM que posiciona CD-20 e foi vendido como um agente terapêutico para tratar linfoma não Hodgkin.

[0008] Entretanto, de acordo com as tendências recentes do mercado de anticorpos, além de desenvolver um anticorpo que possui a funcionalidade para um único posicionamento, uma pesquisa extensiva voltada para o desenvolvimento de um autodenominado anticorpo direcionado a dois alvos (anticorpo bi-específico) ou um anticorpo de multi-posicionamento (anticorpo multi-específico), que pode possuir dois ou mais posicionamentos ao mesmo tempo, foi ativamente realizada (Van Spriel et al., Immunol. Hoje, 21:391, 2000; Kufer et al., Trend in Biotechnol., 22:238, 2004; Marvin and Zhu, Curr.

Opin. Drug Discovery Dev., 9:184, 2006). Entre esses anticorpos que pertencem a essa classe, não caso onde qualquer anticorpo é aprovado pela FDA e produzida em uma escala comercial. Entretanto, esses anticorpos foram constantemente estudados em laboratório e níveis clínicos sobre a base dos interesses e potenciais contínuos. Os anticorpos que pertencem a essa classe são basicamente classificados em (1) anticorpos baseados em ScFv, (2) anticorpos baseados em Fab, e (3) anticorpos baseados em IgG, etc.

[0009] Primeiro, no caso do anticorpo de multiposicionamento baseado em ScFv-, há um anticorpo bivalente obtido ao combinar VL e VH de ScFvs diferentes e com um ScFv híbrido de forma heterodimérica (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6444, 1993). Entretanto, tal anticorpo possui um problema de estabilidade insatisfatória devido à afinidade de ligação com heterodímeros. Também, ScFv obtido ao ligar ScFvs diferentes uns aos outros (Kipriyanov et al., J. Mol. Biol., 293:41, 1999; Robinson et al., Brit. J. Cancer, 99:1415, 2008), o ScFv heterodimérico obtido ao expressar Jun e Fos que possuem um potencial de ligação com as terminações de ScFvs diferentes (de Kruif e Logtenberg, J. Biol. Chem., 271:7630, 1996), um mini-anticorpo heterodimerico obtido ao expressar CH1 e CL de Fab a partir das terminações de ScFv, respectivamente (Muller et al., FEBS lett., 432:45, 1998), e um método para construir um mini-corpo em uma forma heterodimerica ScFv (Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677, 1998) foram relatados. Nesse caso, o método para construir o minicorpo inclui substituir alguns aminoácidos de um domínio CH3 que é um domínio homodimérico de Fc para alterar uma estrutura heterodimerica em uma forma "knob into hole" e expressar esses domínios CH3 modificados a partir das terminações de ScFv, respectivamente. Ademais, uma variedade de análogos baseados em ScFv foi relatada na literatura científica (Kipriyanov e Le Gall, Curr. Opin. Drug Discovery Dev., 7:233,

2004), e um ScFv de triplo posicionamento que utiliza um anticorpo trivalente e um ScFv de posicionamento quádruplo que utiliza um anticorpo tetravalente também foram relatados na literatura científica (Hudson e Kortt, J. Immunol. Methods, 231:177, 1999).

[00010] Segundo, o anticorpo de multiposicionamento baseado em Fab possui principalmente a forma de Fab heterodimerico obtido ao combinar Fab's separados com antígenos específicos utilizando uma ligação de dissulfeto ou um mediador (Brennan et al., Science, 229:81, 1985; Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547, 1992). Entretanto, foi relatado que um anticorpo direcionado a dois alvos que possui duas valências de antígeno é produzido ao expressar ScFvs contra antígenos diferentes das terminações de uma cadeia pesada ou uma cadeia leve de Fab específico (Schoonjans et al., J. Immunol., 165:7050, 2000; Lu et al., J. Immunol. Methods, 267:213, 2002), e um anticorpo direcionado a dois alvos é produzido em uma forma homodimérica para possuir quatro valências de antígeno ao interpor uma região de dobradiça entre Fab e ScFv (Coloma e Morrison, Nat. Biotechnol., 15:159, 1997). Também, um anticorpo bivalente direcionado a dois alvos produzido com três valências para antígenos ao fundir ScFvs contra antígenos diferentes com as terminações da cadeia leve e cadeia pesada de Fab, e um anticorpo bivalente de triplo posicionamento produzido com três valências para antígenos ao fundir ScFvs diferentes respectivamente com as terminações da cadeia leve e cadeia pesada de Fab também foram relatados na literatura científica (Schoonjans et al., J. Immunol., 165:7050, 2000). Também, um anticorpo de triplo posicionamento F(ab')₃ produzido de forma simples ao conjugar quimicamente três Fabs diferentes também foi relatado (Tutt et al., J. Immunol., 147:60, 1991).

[00011] Terceiro, no caso do anticorpo de multiposicionamento baseado em IgG, um hibridoma híbrido que produz um anticorpo direcionado a dois alvos, autodenominado quadroma foi obtido por Trion

Pharma ao hibridizar hibridomas de camundongos e ratos. O anticorpo direcionado a dois alvos Ertumaxomab (antígeno: Her-2/neu, CD3) produzido por essa empresa procedeu em ensaios de fase II para câncer de mama metastático (Kiewe e Thiel, Expert Opin. Investig. Drugs, 17:1553, 2008), e Catumaxomab (antígeno: EpCAM, CD3) procedeu em ensaios de fase II para câncer gástrico e câncer ovariano e ensaios de fase III para ascites malignos (Shen e Zhu, Curr. Opin. Mol. Ther., 10:273, 2008). Entretanto, esses anticorpos não podem excluir a reação de um anticorpo anticamundongo humano (HAMA) ou anticorpo antirrato humano (HARA) causada por sua administração repetida. Entretanto, um anticorpo direcionado a dois alvos de "Holes e Knob" produzido de forma heterodimérica ao modificar alguns aminoácidos de um domínio homodimérico CH3 de Fc para cadeia pesadas diferentes enquanto compartilha um domínio de cadeia leve também foi relatado (Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677, 1998). Além do anticorpo direcionado a dois alvos em uma forma heterodimérica, foi relatado que (ScFv)₄-IgG (antígeno: EGFR, IGF-1R) é expresso em uma forma homodimérica ao fundir dois ScFvs diferentes com os domínios constantes de uma cadeia leve e uma cadeia pesada de IgG em vez dos domínios variáveis dessas (Lu et al., J. Biol. Chem., 279:2856, 2004). Entretanto, esse anticorpo possui um problema de produtividade muito baixa, porém o mesmo grupo de pesquisa produziu um dianticorpo bivalente com produtividade aprimorada ao mesmo posicionamento ao compensar o problema de (ScFv)₄-IgG, e confirmou seus potenciais (Lu et al., J. Biol. Chem., 280:19665, 2005). Entretanto, tal anticorpo não superou o problema de estabilidade insatisfatória do anticorpo bivalente. Também, Shen et al. de Imclone produziu um anticorpo direcionado a dois alvos ao fundir apenas um único domínio variável para o receptor- α (PDGFR- α) de fator de crescimento derivado de plaquetas de camundongo com o N-Terminal de uma cadeia leve de

um anticorpo monoclonal quimérico IMC-1C11 contra VEGFR-2 humano, e relatou seus potenciais (Shen et al., J. Biol. Chem., 281:10706, 2006; Shen et al., J. Immunol. Methods, 318:65, 2007). Recentemente, Rossi et al. propôs um anticorpo com múltiplas valências de antígeno para CD20 por um método autodenominado "dock and lock (DNL)" utilizando um domínio de dimerização e acoplamento (DDD) de uma subunidade R de proteína quinase A (PKA) e um domínio de ancoragem de PKA (Rossi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103:6841, 2006; Rossi et al., Cancer Res., 68:8384, 2008), e o mesmo grupo de pesquisa relatou um anticorpo direcionado a dois alvos sobre a base de tal técnica (Chang et al., Clin. Cancer Res., 13:5586, 2007). Sabe-se que os anticorpos que utilizam o método DNL possuem vantagens, pois esses são fáceis de aplicar, podem ser variadamente combinados visto que são produzidos em um tipo de módulo, e possuem excelente estabilidade *in vivo*, porém possuem problemas, pois esses podem ser degradados por proteinase *in vivo* e possuem problemas relacionados à imunogenicidade.

[00012] Há vários anticorpos direcionado a dois alvos ou múltiplos posicionamentos relatados na literatura científica e até o momento, e esses anticorpos possuem vantagens e desvantagens funcionais dependendo das características morfológicas de acordo com seus uses pretendidos. Em particular, a pesquisa extensiva destinada a desenvolver anticorpos terapêuticos direcionado a dois alvos e múltiplos posicionamentos para tratar câncer continua a progredir. Entretanto, é muito importante selecionar antígenos posicionados pelos anticorpos obtidos através de tal pesquisa de modo que os anticorpos possam realizar suas próprias funções.

Descrição

Problema da Técnica

[00013] Portanto, para desenvolver um anticorpo direcionado a dois

alvos para o tratamento contra o câncer utilizando a inibição de angiogênese, os presentes inventores produziram um anticorpo direcionado a dois alvos, que pode neutralizar dois receptores, VEGFR-2 e Tie-2, que estão estreitamente associados ao mecanismo de angiogênese, em uma nova forma que não foi relatada até o momento, confirmando que o anticorpo mostra um efeito anticâncer equivalente ou, melhor, mesmo *in vivo* bem como em um nível celular comparado com um anticorpo de único posicionamento contra VEGFR-2 ou Tie-2, e concluíram a presente invenção.

[00014] Um objetivo da presente invenção é proporcionar um anticorpo direcionado a dois alvos de uma nova forma que possua um ligante solúvel em água fundido com o N-Terminal de uma cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo.

[00015] Outro objetivo da presente invenção é proporcionar um DNA que codifique o anticorpo direcionado a dois alvos.

[00016] Ainda outro objetivo da presente invenção é proporcionar um vetor de expressão recombinante que contenha o DNA.

[00017] Ainda outro objetivo da presente invenção é proporcionar uma célula hospedeira transformada no vetor de expressão recombinante.

[00018] Ainda outro objetivo da presente invenção é proporcionar um método para produzir um anticorpo direcionado a dois alvos mediante a incubação da célula hospedeira.

[00019] Um objetivo adicional da presente invenção é proporcionar uma composição farmacêutica que inclua o anticorpo direcionado a dois alvos.

Solução da Técnica

[00020] A presente invenção proporciona um anticorpo direcionado a dois alvos de uma nova forma que possui um ligante solúvel em água fundido com o N-Terminal da cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo.

[00021] O termo "anticorpo" usado na descrição da presente invenção se refere a uma molécula de proteína que é produzida por células B para identificar especificamente vários tipos de antígenos e serve como um receptor de antígeno das células B. Essa molécula está em um formato de Y, e consiste em duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Todas as cadeias leves e cadeias pesadas incluem regiões variáveis e constantes. As quatro cadeias são fixadas por ligações de dissulfeto localizadas em regiões flexíveis das cadeias pesadas, que são referidas como uma região de dobradiça. As regiões variáveis em todas as cadeias pesadas e cadeias leves se ligam umas às outras para formar dois sítios de ligação ao antígeno idênticos. Os anticorpos são classificados em cinco classes pela região constante de cadeia pesada: A(IgA), D(IgD), E(IgE), G(IgG) e M(IgM). Cada classe é referida como um isotipo, e possui características estruturais exclusivas e propriedades biológicas diferentes. A presente invenção inclui anticorpos de todos os isotipos, e IgG é, de preferência, usada.

[00022] De preferência, o anticorpo de acordo com a presente invenção inclui um anticorpo contra um antígeno que é especificamente expresso em uma célula neoplásica, uma célula estromal cancerosa, uma célula endotelial associada ao tumor, uma célula progenitora endotelial associada ao tumor, uma célula endotelial de circulação associada ao tumor, uma célula tumoral de circulação, uma célula-tronco cancerosa, etc., porém a presente invenção não se limita a isso.

[00023] Mais particularmente, o anticorpo de acordo com a presente invenção inclui um anticorpo contra uma proteína expressa sobre a superfície de uma célula como um receptor-1 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-1), um receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2), um receptor-3 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-3), uma tirosina quinase 3 semelhante à FMS (FLT3), um receptor do fator 1 de estimulação de c-FMS/colônia

(CSF1R), uma célula rearranjada durante transfecção (RET), um fator de transição epitélio-mesenquimal (c-Met), um receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), Her2/neu, HER3, HER4, receptores do fator de crescimento de fibroblasto (FGFRs), um receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR), receptores do fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFRs), um receptor do fator de célula-tronco (c-KIT), uma região restrita de quebra (BCR), integrina, metaloproteinases de matriz (MMPs), etc., porém a presente invenção não se limita a isso.

[00024] Na presente invenção, o anticorpo pode ser um anticorpo "policlonal" ou "monoclonal", e com mais preferência, um anticorpo monoclonal. O anticorpo monoclonal se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea. Ou seja, os anticorpos individuais que constituem tal população são idênticos, exceto pelas possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em uma pequena quantidade. O anticorpo monoclonal é altamente específico a uma única região antigênica. Ademais, diferente dos anticorpos policlonais que incluem anticorpos diferentes para epítomos diferentes, cada anticorpo monoclonal é induzido contra um único epítomo sobre o antígeno. Não se deve interpretar a exigência que o anticorpo monoclonal deve produzir um anticorpo de qualquer maneira determinada. Por exemplo, um anticorpo monoclonal útil na presente invenção pode ser produzido por um método de hibridoma descrito em Kohler et al., Nature, 256:495(1975) ou produzido por um método de DNA recombinante (veja a Patente norte-americana No. 4.816.567). Também, o anticorpo monoclonal pode ser, por exemplo, isolado da biblioteca de anticorpos apresentada em fagos por uma técnica descrita em Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991).

[00025] O anticorpo da presente invenção é, de preferência, um

"anticorpo humanizado". O termo "anticorpo humanizado" se refere a um anticorpo que inclui uma sequência de aminoácido que é parcial ou completamente derivada da linhagem germinativa de anticorpo humano ao alterar a sequência de um anticorpo que possui uma região determinante de complementaridade não humana (CDR). Através do método de alteração, é a maneira mais simples de substituir meramente uma região constante de murino com uma região constante de um anticorpo humano. Então, produz-se uma quimera humana/murina, que pode reduzir suficientemente a imunogenicidade tão baixa quanto às aplicações farmacêuticas permissíveis. Entretanto, prefere-se que a região variável e ainda a CDR do anticorpo sejam humanizadas por uma técnica conhecida. A região de estrutura da região variável é substituída por uma região de estrutura humana correspondente enquanto a CDR não humana é substancialmente mantida intacta ou a CDR é trocada por uma sequência derivada do genoma humano. Um anticorpo humano intacto é produzido em um camundongo geneticamente modificado cujo sistema imune é modificado para corresponder ao sistema imune humano.

[00026] O anticorpo da presente invenção é particularmente, de preferência, um "anticorpo humano". O anticorpo humano é um anticorpo que possui uma sequência de aminoácido correspondente a uma sequência de aminoácido de um anticorpo produzido por qualquer técnica para produzir um anticorpo produzido por um humano ou um anticorpo humano. O anticorpo humano pode ser produzido por várias técnicas conhecidas. De acordo com uma modalidade, o anticorpo humano é examinado a partir da biblioteca de fagos que expressa um anticorpo humano (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314(1996); Sheets et al. *PNAS (USA)* 95:6157-6162(1998); Hoogenboom e Winter, *J.Mol.Biol.* 227:381(1991); Marks et al. *J.Mol.Biol.* 222:581(1991)). O anticorpo humano pode ser produzido ao introduzir

um locus de imunoglobulina humana em um animal transformado, por exemplo, um camundongo cujos genes de imunoglobulina endógenos são parcial ou completamente inativados. Durante o desafio, observou-se que um anticorpo humano foi produzido, que o mesmo é altamente similar como observado no humano em todos os aspectos de rearranjo genético, montagem e repertório de anticorpos. Tais métodos são descritos, por exemplo, na Patente Nos. U.S. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016 e Marks et al. *Biotechnology* 10:779-783(1992); Lonberg et al. *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild et al. *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93(1995). Em outro método, o anticorpo humano pode ser produzido por imortalização de linfócito B humano (por exemplo, o linfócito B pode ser recuperado de uma população, ou imunizado *in vitro*) que produz um anticorpo induzido contra um antígeno-alvo (Cole et al. *Monoclonal Antibodies e Cancer Therapy*, Alan R Liss, p.77(1985); Boerner et al. *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991); e Patente No. USA 5.750.373).

[00027] O termo "ligante solúvel em água" usado na descrição da presente invenção significa uma parte ou toda uma proteína que se liga especificamente a um receptor presente em uma célula, particularmente sobre a superfície de uma célula e mostra uma propriedade solúvel em água de modo que o mesmo possa ser solúvel em água. Por exemplo, o ligante solúvel em água inclui, porém sem caráter imitativo, um fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator de crescimento epidérmico (EGF), um fator de crescimento placentário (PIGF), um fator de crescimento fibroblástico (FGF), um fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), um fator de crescimento de hepatócito (HGF), angiopoietina, etc.

[00028] No anticorpo direcionado a dois alvos de uma nova forma de

acordo com a presente invenção, o anticorpo e o ligante exercem suas funções exclusivas.

[00029] Entretanto, o anticorpo direcionado a dois alvos pode inibir ou amplificar dois sinais ao mesmo tempo, e, assim, o mesmo pode ser mais eficaz comparado com o caso onde um sinal é inibido ou amplificado. Comparado com o caso onde cada sinal é tratado com um inibidor de sinal, uma baixa dose pode ser administrada, e dois sinais podem ser inibidos ou amplificados ao mesmo tempo e no mesmo espaço.

[00030] Na presente invenção, prefere-se que o anticorpo seja fundido com um ligante solúvel em água através de um ligante. Na presente invenção, o termo "ligante" se refere a um fragmento peptídico que conecta duas porções de uma proteína de fusão. Na presente invenção, um ligante adequado inclui um peptídeo que possui 5 a 25 aminoácidos, de preferência, 10 a 20 aminoácidos, e com mais preferência, 10 a 15 aminoácidos.

[00031] Para produzir o anticorpo direcionado a dois alvos da presente invenção, produz-se uma sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo direcionado a dois alvos. A sequência de ácido nucleico pode ser construída ao fundir o 3'Terminal de uma sequência de ácido nucleico que codifica um ligante solúvel em água com a 5'terminal de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo. Em um aspecto, a sequência de ácido nucleico que codifica o anticorpo direcionado a dois alvos fundido através do ligante pode ser obtida ao projetar uma sequência de ácido nucleico de um ligante que será contida em um iniciador e irá realizar a PCR.

[00032] Um gene de codificação do anticorpo direcionado a dois alvos produzido desse modo é ligado formando um vetor para preparar um plasmídeo de expressão recombinante, sendo que o plasmídeo é

introduzido em uma célula hospedeira para preparar uma célula transfectante ou transformante, a célula hospedeira é amplificada e incubada, e um anticorpo direcionado a dois alvos é isolado e purificado, obtendo assim o anticorpo direcionado a dois alvos desejado.

[00033] Na presente invenção, a célula hospedeira usada para a expressão do anticorpo direcionado a dois alvos pode ser uma célula procariótica ou eucariótica. Também, uma célula hospedeira onde um DNA é introduzido em alta eficiência e possui alta eficiência de expressão do DNA introduzido é geralmente usada. Exemplos da célula hospedeira incluem hospedeiros eucarióticos e procarióticos como *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., bactérias e leveduras, células de insetos como *Spodoptera Frugiperda* 9 (SF9), células animais como uma célula ovariana de hamster chinês (CHO) e uma célula de camundongo, células 293 de rim de embrião humano COS1, COS7, célula de macaco-verde africano como BSC 1, BSC 40 e BMT 10, e células humanas cultivadas em tecido.

[00034] Na presente invenção, uma variedade de combinações de hospedeiro/vetor de expressão pode ser usada para expressar o anticorpo direcionado a dois alvos. Por exemplo, os vetores de expressão adequados para o hospedeiro eucariótico incluem SV40, papilomavírus bovino, adenovírus, vírus adeno-associado, citomegalovírus, e retrovírus. Os vetores de expressão que podem ser usados para o hospedeiro bacteriano incluem plasmídeos bacterianos como pBluescript, pGEX2T, pUC, pCR1, pBR322, pMB9 e derivados desses, um plasmídeo como RP4 que possui uma faixa mais ampla de hospedeiros, λ gt10 e λ 11, DNA de fago representado como vários derivados de fago lambda como NM989, outros fagos de DNA como M13 e fago de DNA de cadeia simples filamentoso. Os vetores de expressão úteis em células de levedura incluem plasmídeo 2 μ e derivados desse. Um vetor útil em células de insetos é pVL941.

[00035] A transformação de um vetor de expressão recombinante em uma célula hospedeira inclui, por exemplo, transfecção mediada por dextrano DEAE, eletroporação, transdução, transfecção de fosfato de cálcio, transfecção mediada por lipídeo catiônico, carregamento por corte e infecção.

[00036] Na presente invenção, a célula hospedeira pode ser incubada em um meio adequado e sob condições que permitam a expressão e/ou isolamento do anticorpo direcionado a dois alvos utilizando fermentação em pequena ou larga escala e incubação em frasco de agitação em um fermentador laboratorial ou industrial. A incubação é realizada em um meio de cultura adequado contendo fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos por uma técnica conhecida. O meio adequado está comercialmente disponível e, por exemplo, pode ser preparado utilizando componentes e suas razões de composição descritas no catálogo da American Type Culture Collection (ATCC).

[00037] O anticorpo direcionado a dois alvos pode ser isolado dessa cultura utilizando os métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o anticorpo direcionado a dois alvos pode ser isolado dessa cultura utilizando um método convencional que inclui, porém sem caráter limitativo, centrifugação, filtração, extração, secagem por aspersão, evaporação ou precipitação. Ademais, o anticorpo direcionado a dois alvos pode ser purificado utilizando vários métodos conhecidos na técnica inclusive cromatografia (ou seja, troca iônica, afinidade, exclusão hidrofóbica e por tamanho), eletroforese, fracionamento (ou seja, precipitação de sulfato de amônio), SDS-PAGE ou extração.

[00038] Uma composição de acordo com a presente invenção pode ser administrada em moléculas específicas através de qualquer via adequada. A composição de acordo com a presente invenção pode ser diretamente (por exemplo, localmente como injeção, injeção subcutânea ou administração local em posições de tecido) ou

sistemicamente (por exemplo, parenteral ou oralmente) administrada em animais que incluem um humano utilizando qualquer meio adequado. Quando a composição de acordo com a presente invenção for administrada de maneira parenteral, por exemplo, intravenosa, subcutânea, ocular, intraperitoneal, intramuscular, oral, retal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intraespinhal, intraventricular, intratecal, intracerebelar, intravesical, intranasal, ou por aspersão, a composição inclui, de preferência, uma porção de uma suspensão ou solução fluida aquosa ou fisiologicamente compatível. Portanto, visto que um veículo ou um excipiente está fisiologicamente disponível, o mesmo não deve exercer um efeito negativo sobre o eletrólito e/ou equilíbrio de volume de pacientes, além da aplicação de uma composição desejada aos pacientes.

[00039] Uma composição farmacêutica que inclui o anticorpo direcionado a dois alvos da presente invenção pode ser formulada em uma formulação oral como pó, grânulo, comprimido, cápsula, suspensão, emulsão, xarope ou aerossol, solução injetável estéril, supositório, e preparação percutânea de acordo com os métodos convencionais, que podem ser usados posteriormente. O veículo, o excipiente, e o diluente que podem ser incluídos na composição podem incluir lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, amido, goma acácia, alginato, gelatina, fosfato de cálcio, silicato de cálcio, celulose, metil celulose, celulose amorfa, polivinilpirrolidona, água, metil hidróxibenzoato, hidróxibenzoato de propila, talco, estearato de magnésio e óleo mineral. A composição pode ser formulada com um diluente ou excipiente como carga, agente de extensão, aglutinante, agente umectante, agente desintegrante ou tensoativo, quando necessário.

[00040] Em um aspecto, o anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção pode ser formulado em uma

preparação sólida oral. A preparação sólida para administração oral inclui um comprimido, uma pílula, um pó, um grânulo, uma cápsula ou similares. Aqui, a preparação sólida pode ser formulada ao misturar ao menos um excipiente, por exemplo, amido, carbonato de cálcio, sucrose, lactose ou gelatina com o extrato. Além do excipiente simples, lubrificantes como estearato de magnésio e talco também podem ser usados.

[00041] Em outro aspecto, a composição farmacêutica que inclui o anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção também pode ser formulada em uma preparação líquida para administração oral. A preparação líquida para administração oral inclui uma suspensão, líquida para uso interno, emulsão, xarope, etc. Tal preparação líquida pode incluir vários excipientes como, por exemplo, agente umectante, agente adoçante, aromático, conservante, etc., além dos diluentes inertes geralmente usados (por exemplo, água destilada, etanol, parafina líquida).

[00042] Ainda em outro aspecto, a composição farmacêutica que inclui o anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção pode ser formulada em uma preparação para administração parenteral, de preferência, administração intraperitoneal. A preparação para administração parenteral inclui solução aquosa estéril, solvente não aquoso, suspensão, emulsão, preparação liofilizada, e supositório. A solução aquosa estéril que pode ser usada aqui inclui uma solução de Hank, uma solução de Ringer ou uma solução tampão adequada como salina fisicamente tamponada, e a suspensão como o solvente não aquoso que pode ser usado aqui inclui óleo vegetal como propileno glicol, polietileno glicol ou óleo de oliva, ou éster injetável como oleato de etila. Quando necessário, antisséptico, agente estabilizante, umectante ou emulsão, e sais e/ou tampão para a regulação de pressão osmótica podem ser usados. Entretanto, no caso do supositório, uma

base convencional como Witepsol, Macrogol, Tween 61, óleo de cacau, manteiga de laurina ou gelatina glicerinada pode ser usada.

[00043] O anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção é com mais preferência DIG 0001 produzido de acordo com uma modalidade da presente invenção.

[00044] Com base em TTAC0001 descrito na Publicação Internacional No. PCT/KR07/003077, a produção do anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 de acordo com a presente invenção foi realizada ao fundir um domínio de ligação de Ang2, que se liga a Tie-2 através de um ligante específico, com uma região amino-terminal de cadeia leve do anticorpo (Exemplos 1 e 2).

[00045] O anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 produzido desse modo foi confirmado para imobilidade através de métodos como SDS-PAGE e *western blotting*, e apenas um anticorpo, que foi purificado para ao menos 95% de pureza por meio de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) utilizando uma coluna de afinidade de proteína A, uma coluna de SP-sefarose ou uma coluna de exclusão por tamanho, foi fixado para exame profundo adicional (Exemplo 3).

[00046] O anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 purificado como descrito acima foi confirmado para afinidade de ligação com VEGFR-2 D1 to D3-Fc e Tie-2-Fc por meio de um ensaio de ligação utilizando ELISA, e um ensaio competitivo em VEGF165 e Ang2 foi realizado por meio de ELISA para confirmar a funcionalidade como um anticorpo direcionado a dois alvos (Exemplo 4).

[00047] De acordo com a presente invenção, através do ensaio de viabilidade de célula em células endoteliais de veia umbilical humana essencialmente cultivadas (HUVEC), foi confirmado que o anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 pode inibir a viabilidade das células HUVEC induzidas por VEGF ou Ang1, e também pode inibir de maneira eficaz a viabilidade das células HUVEC induzidas por VEGF e Ang1

(Exemplo 5).

[00048] Através do ensaio de migração celular, foi confirmado que o anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 de acordo com a presente invenção pode inibir a mobilidade das células HUVEC induzidas por VEGF ou Ang1, e também pode inibir de maneira eficaz a mobilidade das células HUVEC induzidas por VEGF e Ang1 (Exemplo 6).

[00049] Através da técnica de *western blotting*, foi confirmado que o anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 de acordo com a presente invenção pode inibir o mecanismo de sinalização de Tie-2 induzido por Ang1 e o mecanismo de sinalização de VEGFR-2 induzido por VEGF, e também foi confirmado que o anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 pode inibir o mecanismos de sinalização induzido por Ang1 e VEGF ao mesmo tempo utilizando a técnica de *western blotting* (Exemplo 7).

[00050] Em particular, foi confirmado que, quando o anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 de acordo com a presente invenção for administrado a um modelo animal de glioblastoma, um tumor foi significativamente reduzido em volume (Exemplo 8).

[00051] O anticorpo mencionado acima foi produzido utilizando o seguinte método. Primeiro, uma sequência de DNA de um domínio de ligação de Ang2 para Tie-2, que pode servir como antagonista para Tie-2, foi amplificada através de PCR. Nesse caso, o anticorpo foi projetado para incluir um DNA ligante DNA no 3'-Terminal do fragmento de DNA amplificado. A produção do anticorpo direcionado a dois alvos que pode se ligar especificamente a VEGFR-2 e Tie-2 foi realizada ao fundir o fragmento de DNA com a 5'terminal de uma sequência de DNA de cadeia leve de TTAC0001 contendo uma parte de um DNA ligante.

[00052] O anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 de acordo com a presente invenção pode ser usado para tratar doenças relacionadas à angiogênese mediante a inibição da angiogênese.

[00053] De acordo com a presente invenção, o termo "doença relacionada à angiogênese" inclui, porém sem caráter limitativo, câncer, degeneração macular relacionada à idade, artrite reumatoide, retinopatia diabética, psoríase e inflamação crônica.

[00054] De acordo com a presente invenção, o câncer inclui, porém sem caráter limitativo, câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de pulmão, câncer de tireoide, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer pancreático, câncer retal, câncer colo-retal, câncer de próstata, câncer de rins, melanoma, câncer metastático ósseo do câncer de próstata, câncer ovariano e câncer no sangue.

[00055] O anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção pode ser administrado em uma quantidade suficiente para impedir, inibir, ou aliviar o progresso de um tumor, por exemplo, crescimento, invasão, metástase e(ou) retorno de um tumor para o propósito de tratamento terapêutico de pacientes com câncer. Para cumprir o propósito, a quantidade adequada é definida como uma quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade eficaz para essa aplicação irá depender da gravidade de uma doença e estados gerais do sistema imune do próprio paciente.

[00056] Um teor preferido de acordo com a presente invenção está em uma faixa de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, e, com mais preferência, 0,1 mg/m² a 10 mg/m².

[00057] Entretanto, uma dose ótima varia de acordo com a doença que será tratada, e a presença de efeitos colaterais, e pode ser determinada através de experimentos convencionais. A administração de um anticorpo pode ser realizada por injeções periódicas de pílulas, ou injeções intravenosas ou intraperitoneais contínuas a partir de um recipiente de armazenamento externo (por exemplo, um saco de veia) ou um recipiente de armazenamento interno (por exemplo, um implante biodegradável). Também, uma proteína de anticorpo de acordo com a

presente invenção pode ser administrada em combinação com uma variedade de moléculas biologicamente ativas diferentes. Entretanto, uma combinação ótima da proteína de anticorpo e das outras moléculas, um método de administração, e uma dose podem ser determinados através de experimentos convencionais no nível técnico dos elementos versados na técnica.

[00058] A composição de acordo com a presente invenção pode ser usada em combinação com outros agentes terapêuticos ou misturada com os outros agentes terapêuticos.

[00059] Quando os tumores inclusive tumores humanos forem tratados com o anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção em combinação com um agente quimioterápico, radiação, ou um antagonista de receptor adicional ou combinações desses, um efeito sinérgico pode ser obtido. Em outras palavras, a inibição de crescimento tumoral causada pelo anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção pode ser inesperadamente aumentada quando usada com o agente quimioterápico, a radiação ou o antagonista do receptor adicional, ou combinações desses. Por exemplo, o efeito sinérgico pode ser exemplificado pela inibição de crescimento tumoral maior esperada do uso da terapia de combinação do que aquela esperada do tratamento com o anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção e o agente quimioterápico, a radiação ou o antagonista de receptor adicional. De preferência, o efeito sinérgico é comprovado devido ao alívio de câncer que não foi esperado pelo tratamento com uma combinação do anticorpo direcionado a dois alvos da presente invenção e o agente quimioterápico, ou o antagonista do receptor adicional.

[00060] O anticorpo direcionado a dois alvos da presente invenção é administrado antes do início da quimioterapia ou radioterapia, após o início dessas terapias, e antes e durante o início de uma combinação

dessas, ou seja, a quimioterapia e/ou radioterapia, antes e após o início dessas terapias, durante e após o início dessas terapias, ou antes, durante e após o início dessas terapias. Por exemplo, o anticorpo DIG 0001 é geralmente administrado 1 a 30 dias, de preferência, 3 a 20 dias, e, com mais preferência, 5 a 12 dias antes do início da radioterapia e/ou quimioterapia.

[00061] Portanto, o anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser usado *in vivo* e *in vitro* para o propósito da pesquisa, prevenção ou tratamento amplamente conhecidos na técnica. Naturalmente, é óbvio que o princípio da presente invenção descrita aqui pode ser alterado e modificado pelos elementos versados na técnica, e tais diversas alterações e modificações podem ser feitas sem que se abandone o escopo da presente invenção.

Efeitos Vantajosos

[00062] A presente invenção proporciona um anticorpo direcionado a dois alvos derivado de um anticorpo monoclonal humano que pode inibir de maneira eficaz um mecanismo de sinalização relacionado à angiogênese ao neutralizar os receptores VEGFR-2 e Tie-2 associados à angiogênese ao mesmo tempo, e uma composição para inibir a angiogênese e tratar câncer inclusive o anticorpo direcionado a dois alvos. O anticorpo direcionado a dois alvos de acordo com a presente invenção mostra um excelente potencial de neutralização, e também é eficaz no tratamento de câncer, comparado com os anticorpos de único posicionamento pré-existent, ao neutralizar dois posicionamentos associados à angiogênese ao mesmo tempo. Para os dois posicionamentos que possuem uma correlação um com o outro, é possível esperar efeitos mais excelentes do que o benefício real derivado do tratamento com o anticorpo de único posicionamento ao construir um anticorpo direcionado a dois alvos de uma nova forma desenvolvida pelos presentes inventores.

Descrição dos Desenhos

[00063] Essas e outras características, aspectos, e vantagens de modalidades preferidas da presente invenção serão mais completamente descritos na seguinte descrição detalhada em conjunto com os desenhos em anexo. Nos desenhos:

[00064] a figura 1 mostra uma sequência de DNA (SEQ ID NO: 6) e as funções de um gene inserido em um vetor plgGLD-mAng2-TTAC0001 lgt.

[00065] A figura 2 mostra esquematicamente um método para construir um vetor plgGLD-mAng2-TTAC0001 lgt de acordo com a presente invenção.

[00066] A figura 3 mostra os resultados obtidos ao expressar aleatoriamente o vetor de acordo com a presente invenção em células CHO-DG44 e determinar a produção de um anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 através da técnica de *western blotting*.

[00067] A figura 4 mostra os resultados de triagem de um clone de alta produtividade com tratamento MTX repetido (até 700 nM) para estabelecer uma linhagem celular de alta produtividade de acordo com a presente invenção.

[00068] A figura 5 mostra os resultados de SDS-PAGE de DIG 0001 purificado.

[00069] A figura 6 mostra os resultados da análise de um ensaio competitivo sobre VEGF e Ang-2-Fc utilizando DIG 0001 por meio de ELISA.

[00070] A figura 7 mostra os resultados de um ensaio de sobrevivência que demonstram a viabilidade de DIG 0001 de acordo com a presente invenção sobre HUVEC.

[00071] A figura 8 mostra os resultados de um ensaio de migração que demonstram a mobilidade de DIG 0001 de acordo com a presente invenção sobre HUVEC.

[00072] A figura 9 mostra os resultados que demonstram a atividade inibitória de fosforilação de VEGFR-2 e ERK por VEGF do anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 de acordo com a presente invenção, e a atividade inibitória de fosforilação de Tie-2, ERK e AKT por Ang1 do mesmo anticorpo.

[00073] A figura 10 mostra os efeitos de DIG 0001 de acordo com a presente invenção sobre a inibição de crescimento tumoral em um modelo murino de glioblastoma.

Modo da Invenção

[00074] Mais adiante nesse documento, os Exemplos a seguir serão descritos meramente para explicar a presente invenção de forma mais específica, e se tornará mais óbvio para os elementos versados na técnica à qual a presente invenção pertence que o escopo da presente invenção não se limita aos Exemplos, dependendo do propósito da presente invenção.

Exemplo 1: Construção de vetor de expressão para a produção de DIG 0001

[00075] Um DNA relacionado ao domínio de ligação de Ang2 que se liga a Tie-2 foi amplificado através de PCR. Para esse propósito, uma linhagem celular EK293 que produz Ang2-RBD humana (Barton et al., Structure, 13:825, 2005) foi gentilmente fornecida pelo Dr. Dimitar B. Nikolov no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center nos Estados Unidos, e o DNA genômico foi extraído, esse foi usado como um modelo. Para amplificar apenas um domínio de ligação Ang2 (F281-F496) a partir do DNA extraído, a PCR foi realizada sob as seguintes condições: Um ciclo a 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos (a 94°C durante 45 segundos/a 50°C durante 45 segundos/a 72°C durante 1 minuto), um ciclo a 72°C durante 7 minutos, e 4°C durante ∞. A composição de reagentes usada aqui é a seguinte: 2 µl (10 pmol/µl) de um iniciador F-ksw001 que possui um sítio de reconhecimento de enzima de restrição

BstXI (5'-CAC TCC AGC GGT GTG GGT TCC TTC AGA GAC TGT GCT GAA GTA TTC, SEQ ID NO: 1), 2 µl (10 pmol/µl) de um iniciador reverso R'-ksw001 (5'-ACT ACC TCC GCC TCC TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, SEQ ID NO: 2), 1 µl (100 ng/µl) de DNA genômico usado como um DNA modelo, 2,5 U i-Max™ II Taq (Intron #25261, Korea) usados como uma polimerase, 5 µl de tampão 10X, 2 µl (cada 2,5 mM) de dNTP, e 37,5 µl de água destilada. O produto obtido através da PCR foi submetido à eletroforese em 1% de gel agarose, e uma banda fraca abaixo de 700 bp foi então isolada utilizando um kit de extração de DNA HiYield™ Gel/PCR (RBC Bioscience #YDF300, Taiwan). A PCR foi reconduzida utilizando o DNA isolado como um modelo para obter um fragmento de domínio de ligação Ang2 que possui um ligante fundido nesse (denominado "mAng2"). O método de PCR usado aqui foi realizado da mesma maneira que no método anterior, exceto que R-ksw001 (5'-GGA GCC TCC TCC GCC ACT ACC TCC GCC TCC TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, SEQ ID NO: 3) foi usado como um iniciador reverso.

[00076] Entretanto, uma cadeia leve região de TTAC0001 usada para fundir o domínio de ligação Ang2 foi amplificada através de PCR sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos (a 94°C durante 30 segundos/a 50°C durante 30 segundos/a 72°C durante 30 segundos), um ciclo a 72°C durante 5 minutos, e a 4°C durante ∞. A composição de reagentes de PCR usada aqui é a seguinte: 2 µl (10 pmol/µl) de um iniciador F-ksw002 ao qual uma parte de um ligante é adicionada (5'-AGT GGC GGA GGA GGC TCC GGT TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG, SEQ ID NO: 4), 2 µl (10 pmol/µl) de a iniciador R-ksw002 contendo um sítio de reconhecimento de enzima de restrição BstXI (5'-CAG ATC TTT CCA CGA GGC TGG CTC CTC, SEQ ID NO: 5), 10 ng de plgGLD-TTAC0001 Lgt (PCT/KR07/003077) usado como um DNA modelo, 2,5 U i-Max™ II Taq (Intron #25261, Korea) usados

como uma polimerase, 5 µl de tampão 10X, 2 µl de dNTP (cada 2,5 mM), e 37,5 µl de água destilada. O produto obtido através da PCR foi submetido à eletroforese em 1% de gel agarose, e um fragmento de cadeia leve TTAC0001 correspondente a aproximadamente 350 bp foi isolado utilizando um kit de extração de DNA HiYield™ Gel/PCR (RBC Bioscience #YDF300, Taiwan) (que foi denominado "TTAC0001 lgt").

[00077] A SOE-PCR foi conduzida para fundir uma região de cadeia leve TTAC0001 (TTAC0001_lgt) com uma região de fragmento Ang2 (mAng2) obtida através da PCR. As condições de PCR usadas aqui são as seguintes: Um ciclo a 94°C durante 4 minutos, 30 ciclos (a 94°C durante 45 segundos/a 50°C durante 45 segundos/a 72°C durante 1 minuto), um ciclo a 72°C durante 7 minutos, e a 4°C durante ∞. Também, a composição de reagentes PCR usada aqui é a seguinte: 2 µl (10 pmol/µl) de um iniciador F-ksw001 que possui um sítio de reconhecimento de enzima de restrição BstXI, 2 µl (10 pmol/µl) de um iniciador R-ksw002, cada 10 ng de mAng2 e TTAC0001 lgt como DNAs modelo, 2,5 U i-Max™ II Taq (Intron #25261, Korea) usados como uma polimerase, 5 µl de tampão 10X, 2 µl de dNTP (cada 2,5 mM), 37,5 µl de água destilada. O produto obtido através da PCR foi submetido à eletroforese em 1% de gel agarose, e um produto de PCR fundido com mAng2-TTAC0001 lgt correspondente a aproximadamente 1 kb foi isolado utilizando um kit de extração de DNA HiYield™ Gel/PCR (RBC Bioscience #YDF300, Taiwan) (que foi denominado "mAng2-TTAC0001 lgt"). O produto de PCR isolado foi inserido em um vetor T utilizando um kit de clonagem TOPcloner TA (Enzymonics #EZ111, Korea), e foi transformado em *Escherichia coli* DH5α. Então, a *E. coli* transformada foi mini-preparada, e tratada com uma enzima de restrição BstXI. Então, um vetor contendo um DNA alvo que possui aproximadamente 1 kb foi terceirizado e sequenciado para confirmar sua sequência base de DNA (figura 1 e SEQ ID NO: 6).

[00078] Um método para construir um vetor de expressão de cadeia leve para a expressão do anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 é o seguinte (figura 2). Primeiro, um vetor de expressão de cadeia leve TTAC0001 plgGLD-TTAC0001 Lgt (PCT/KR07/003077) mantido pelos presentes pesquisadores foi digerido com BstXI, e um fragmento que pode ser usado como um vetor foi separado de 1% de gel agarose através da eletroforese. Também, o vetor T no qual mAng2-TTAC0001 lgt foi inserido foi também digerido com BstXI, e apenas um fragmento digerido foi separado de 1% de gel agarose através da eletroforese. Então, os dois fragmentos separados foram mantidos na presença de um T4 DNA ligase (Enzymomics #M001S, Korea) a 4°C durante aproximadamente 12 horas para construir um vetor intacto. Então, a *E. coli* DH5α foi transformada no vetor construído, minipreparada, e então digerida com BstXI para confirmar se mAng2-TTAC0001 lgt foi ou não inserido no vetor construído. O vetor recombinante confirmado foi denominado "plgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt".

Exemplo 2: Produção e identificação de DIG 0001

[00079] O vetor de expressão de cadeia leve construído plgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt e o vetor de expressão de cadeia pesada pré-existente plgGHD-TTAC0001 Hvy (PCT/KR07/003077) foram cotransduzidos em células CHO-DG44 (dhfr-deficiente CHO) para induzir sua expressão voluntária, e a expressão foi confirmada utilizando SDS-PAGE e técnica de *western blotting*. A transdução foi realizada utilizando lipofectamine™ 2000 (Invitrogen #11668-019, USA), e seu procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, as células 5×10^5 CHO-DG44 foram inoculadas em cada poço de uma placa de 6 poços contendo um meio αMEM (Welgene, Korea), e densamente incubadas até uma densidade celular atingir aproximadamente 80 a 90% mantendo as células CHO-DG44 a 37°C durante 24 horas em uma incubadora de CO₂ (5%) com umidade. 3 µg

de um vetor recombinante (1,5 µg de plgGHD-TTAC0001 Hvy e 1,5 µg de plgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt) e 6 µl de lipofectamin™ 2000 foram diluídos em cada 250 µl de meio αMEM isento de soro, e mantidos à temperatura ambiente durante 5 minutos. Uma solução diluída de DNA e uma solução diluída de lipofectamin® 2000 foram misturadas e reagidas à temperatura ambiente durante 20 minutos para formar um complexo DNA-lipofectamin® 2000. O meio pré-existente foi removido das células cultivadas, e 500 µl do complexo DNA-lipofectamin™ 2000 e 500 µl de um meio αMEM isento de soro foram adicionados a cada poço, e incubados a 37°C durante 6 horas em uma incubadora de CO₂. 1 ml de um meio αMEM contendo 20% de soro bovino fetal dialisado foi adicionado, e incubado durante 48 a 72 horas. Então, apenas um sobrenadante foi separado, e a expressão do anticorpo foi confirmada utilizando SDS-PAGE e técnica de *western blotting* (figura 3). A SDS-PAGE e a técnica de western foram realizadas de acordo com o método amplamente usado na técnica, e as amostras usadas são as seguintes: 12% de SDS- gel de poliacrilamida, uma membrana de PVDF (Millipore #IPVH00010, USA), um anticorpo anti-humano de cabra IgG (kappa) conjugado com HRP, e um anticorpo anti-humano de cabra IgG (Fc) conjugado com HRP (Pierce, USA).

Exemplo 3: Estabelecimento de linhagem celular para a produção de DIG 0001 e separação e purificação de anticorpo

[00080] Uma linhagem celular de produção de DIG 0001 foi estabelecida utilizando células CHO-DG44 (dhfr-deficiente CHO). Um procedimento de transdução para estabelecer uma linhagem celular CHO-DG44 de expressão de anticorpo recombinante foi conduzido da mesma maneira que aquela descrita acima. Para examinar as células CHO-DG44 transduzidas (dhfr-positivo), um meio αMEM isento de hipoxantina-timidina-foi usado, e 500 µg/ml de G418 (Sigma-aldrich, USA) e 400 µg/ ml de zeocina (Invitrogen, USA) foram usados como

marcadores de seleção para examinar essencialmente as células transduzidas CHO-DG44. Para obter uma colônia monoclonal na qual o anticorpo recombinante foi expresso, as células essencialmente examinadas foram diluídas para uma densidade de 10 células/ml, e inoculadas em uma placa de 96 poços (Nunc, USA). Então, as células diluídas foram incubadas durante 2 semanas, e uma única colônia que se diferencia de uma única célula foi separada para estabelecer um clone de célula-mãe. Para obter uma linhagem celular de alta expressão, o clone de célula-mãe foi sequencialmente subcultivado 3 a 5 vezes em um meio suplementado com concentrações variadas (40 nM, 80 nM, 160 nM, 320 nM, e 700 nM) de metotrexato (MTX), e seu nível de expressão foi confirmado utilizando ELISA. Para esse propósito, 2 µg/ml de um anticorpo primário, IgG anti-humano de cabra (Fc) (Pierce, USA), foram adicionados a uma concentração de 100 µl à placa de 96 poços, e mantidos a 4°C durante 12 horas para concluir o procedimento de revestimento. Então, uma solução restante em cada poço foi descartada, 200 µl de uma solução de bloqueio contendo 2% de leite sem gordura com 1x PBS foram adicionados a cada poço, e mantidos a 37°C durante 1 hora. Cada poço foi repetidamente lavado três vezes com um tampão de lavagem contendo 0,05% de Tween-20 com 1x PBS, e 100 µl de um caldo de cultura celular obtido a partir da linhagem celular CHO-DG44 de expressão de anticorpo foram então adicionados, e reagidos à temperatura ambiente durante 1 hora. Cada poço foi lavado novamente três vezes com um tampão de lavagem, e um anticorpo secundário, IgG (kappa) anti-humano conjugado com HRP, foi então diluído com um tampão de lavagem em uma razão de 1:5.000, e 100 µl da solução de anticorpo resultante foram reagidos à temperatura ambiente durante 1 hora. Cada poço foi lavado novamente três vezes com um tampão de lavagem, e 100 µl de um reagente de substrato TMB (BD biosciences, USA) foram adicionados, reagidos

durante 5 a 10 minutos. Então, 50 µl de 2N de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) foram adicionados para interromper uma reação cromogênica. Um valor de densidade óptica (O.D) em 450 a 650nm foi calculado utilizando um leitor de microplaca (Tecan, Switzerland). Para reconfirmar os resultados, o ELISA foi realizado da mesma maneira que aquela descrita acima utilizando VEGFR-2 e Tie-2 como anticorpos primários e IgG (kappa) anti-humano de cabra conjugado com HRP como um anticorpo secundário. Por fim, um clone que mostra uma alta taxa de expressão em 700 nM MTX foi estabelecido como uma linhagem celular de alta expressão (figura 4). A incubação da linhagem celular de alta expressão foi realizada em um meio αMEM (Welgene, Korea) suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado (KDR, Korea), 100 unidades/ml de penicilina (Hyclone, USA) e 100 µg/ml de estreptomicina (Hyclone, USA), e a cultura celular foi realizada em uma incubadora a 37°C sob uma condição de ar misturado com 5% de CO₂ com umidade.

[00081] O anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 obtido a partir da incubação da linhagem celular de alta expressão foi submetido a FPLC com uma coluna de afinidade de proteína A, uma coluna de SP-sefarose ou uma coluna de exclusão por tamanho para fixar apenas um anticorpo, que foi purificado para ao menos 95% de pureza para exames profundos adicionais (figura 5). Primeiro, um caldo de cultura foi centrifugado para separar um palete celular e um meio, e DIG 0001 no meio separado foi concentrado através de uma membrana UF (Millipore, USA) que possui um corte de peso molecular de 10.000 Da ou menos. O meio filtrado através da membrana UF foi essencialmente purificado utilizando cromatografia de afinidade de proteína A. Esse procedimento é brevemente descrito, como exposto a seguir. O meio filtrado através da membrana UF foi colocado em uma coluna de proteína A contendo 0,1 M de NaCl estabilizada com 20 mM de fosfato de sódio (pH 7,0), e

uma proteína não ligada foi lavada com o mesmo tampão. Então, uma proteína que se liga de maneira não específica a uma resina de proteína A foi lavada novamente com 20 mM de uma solução tampão de fosfato de sódio (pH 7,0) contendo 0,5 M de NaCl. Uma proteína que se liga especificamente à proteína-A foi eluída com um tampão de 0,1 M Glicina-Cl (pH 3,5) contendo 0,1 M de NaCl, e uma amostra foi neutralizada com uma solução de 1 M Tris com pH 6,0. Para impedir a contaminação de DNA, a endotoxina e a proteína-A que podem permanecer na amostra fracionada através da coluna de afinidade, a cromatografia de troca catiônica foi realizada, conforme exposto a seguir. Primeiro, uma amostra eluída a partir de uma coluna de proteína-A foi misturada com o mesmo volume de um tampão de 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,0). Então, uma coluna de SP-sefarose (5 ml, GE healthcare) foi estabilizada com um tampão de 10 mM de fosfato de sódio (pH 6,0) contendo 50 mM de NaCl, e uma amostra foi adicionada, e o DNA não ligado e a endotoxina foram lavados. As moléculas de anticorpo que se ligam a uma resina foram eluídas utilizando um valor de pH e um gradiente salino (50 mM de fosfato de sódio (pH 7,0), 1 M de NaCl). Por fim, para remover um anticorpo multimérico, a amostra foi colocada em uma coluna Superdex 200 (16 mm x 60 cm, GE healthcare) estabilizada com PBS, e submetida à cromatografia de exclusão por tamanho. Tal anticorpo que é submetido ao procedimento de purificação foi usado para realizar a análise celular e *in vivo*.

Exemplo 4: Ensaio Competitivo de DIG 0001

[00082] Um ensaio competitivo foi realizado utilizando ELISA para determinar se o anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001 compete ou não com VEGF e Ang2 sobre VEGFR-2 e Tie-2. Para esse propósito, cada VEGF165 e Ang2-RBD foi dividido em uma concentração de 200 ng em uma placa de 96 poços, e a placa de 96 poços foi revestida à temperatura ambiente durante um dia. Então, uma reação foi realizada

a 37°C durante 2 horas utilizando 2% de leite sem gordura /PBS. Quando a reação foi concluída, a placa de 96 poços foi lavada com PBS, e o grupo de mistura A (obtido ao misturar concentrações variadas (0 a 250 nM) de DIG 0001 com VEGFR-2(ECD1-3) onde 100 ng de Fc são cortados), que foi anteriormente reagido à temperatura ambiente durante 1 hora, foi colocado em cada poço revestido com VEGF165, e reagido à temperatura ambiente durante 2 horas. Então, um grupo de mistura B (obtido ao misturar concentrações variadas (0 a 250 nM) de DIG 0001 com 500 ng de Tie-2-Fc), que foi anteriormente reagido à temperatura ambiente durante 1 hora, foi colocado em cada poço, que foi revestido com Ang2-RBD da mesma maneira que aquela descrita acima, e reagido à temperatura ambiente durante 2 horas. Após a reação de 2 horas ser concluída, a placa de 96 poços foi lavada com PBS, 5 µg/ml de um anticorpo de camundongo anti-VEGFR-2 (Reliatech, Germany) foram adicionados como um anticorpo de reação primário a cada poço revestido com VEGF165, e reagidos a 37°C durante 1 hora. Após cada poço revestido com Ang2-RBD ser lavado com PBS, 5 µg/ml de um anticorpo de camundongo anti-Tie-2 (Abcam, England) foram adicionados como um anticorpo primário a cada poço, e reagidos a 37°C durante 1 hora da mesma maneira que aquela descrita acima. Portanto, um anticorpo IgG anti-camundongo de cabra conjugado com HRP (Abcam, England) foi diluído em uma razão de 1:5000, adicionado como um anticorpo secundário a ambos os poços revestidos com VEGF165 e Ang2-RBD, e reagido a 37°C durante 1 hora. Então, um reagente de substrato TMB (BD Biosciences #555214, USA) foi usado para induzir uma reação cromogênica, e 50 µl de uma solução de 2N de ácido sulfúrico (H₂SO₄) foram adicionados para interromper a reação cromogênica. A medida da reação cromogênica foi realizada em uma absorbância de 450 nm e 650 nm utilizando um leitor de microplaca (Tecan, Switzerland) (figura 6).

Exemplo 5: Ensaio de sobrevivência de HUVEC após o tratamento com DIG 0001

[00083] Para verificar uma alteração na viabilidade de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) após o tratamento com DIG 0001, um ensaio de sobrevivência celular foi realizado. A incubação de HUVEC foi realizada em um meio M199 isento de vermelho de fenol (Invitrogen, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Hyclone, USA), 100 unidades/ml de penicilina (Hyclone, USA), 100 µg/ml de estreptomicina (Hyclone, USA), 3 ng/ml de um fator de crescimento fibroblástico (Upstate Biotechnology, USA), e 5 unidades/ml de heparina (Sigma-Aldrich, USA), e a cultura celular foi realizada em uma incubadora a 37°C sob uma condição de ar misturado com 5% de CO₂ com umidade. Para o ensaio de sobrevivência de células endoteliais vasculares, essas células foram colocadas em uma placa de 24 poços e incubadas durante 24 até uma densidade celular atingir 2×10^4 células/poço. Então, a placa de 24 poços foi lavada duas vezes com um meio M199, e as células foram incubadas durante 6 horas sob uma condição de baixa concentração de soro em um meio M199 suplementado com 1% de soro fetal bovino (Hyclone, USA). As células foram pré-tratadas com concentrações variadas de um anticorpo durante 30 minutos, e então tratadas com 10 ng/ml de VEGF (R&D systems, USA) e 100 ng/ml de Ang1 (R&D systems, USA). Após a incubação de 48 horas, as células foram tratadas com WST-8 (Dojindo, Japão) durante 2 horas, e uma absorbância da cultura celular foi medida em um comprimento de onda de 450 nm. Então, as viabilidades celulares obtidas sob cada condição foram comparadas (figura 7).

Exemplo 6: Ensaio de migração de HUVEC após o tratamento com DIG 0001

[00084] Para verificar a inibição de mobilidade (quimiotaxia) de HUVEC em DIG 0001, um ensaio de migração celular foi realizado. Para

o ensaio de migração de HUVEC, um transpôco de filtro de polycarbonato com tamanho de poro de 8 µm (Corning, USA) foi usado. Antes de seu uso, uma superfície inferior de um filtro foi revestida com 10 µg de gelatina, e seca. 10 ng/ml de VEGF e 100 ng/ml de Ang1 foram adicionados aos poços inferiores inclusive um meio M199 suplementado com 1% de soro fetal bovino. As células endoteliais vasculares, que foram incubadas em uma baixa concentração de soro durante 6 horas, foram separadas mediante tratamento com tripsina, e suspensas em um meio M199 suplementado com 1% de soro fetal bovino até uma densidade celular atingir 1×10^6 células/ml. As células endoteliais vasculares, que foram pré-tratadas com concentrações variadas de um anticorpo durante 30 minutos, foram uniformemente aspergidas em uma concentração de 100 µl sobre um transpôco superior, e incubadas a 37°C durante 3,5 horas em uma incubadora celular. As células cultivadas foram coradas com hematoxilina-eosina (Sigma, USA) ou violeta de cristal (Sigma, USA), as células não migradas aderidas a uma superfície superior de um filtro foram removidas com um chumaço de algodão, e as células migradas aderidas a uma superfície inferior do filtro foram deixadas. Fotografias foram tiradas das células 100 x de ampliação sob um microscópio óptico (Olympus, IX71, Japão) equipado com uma câmera digital para comparar as contagens das células migradas, e 10 imagens obtidas sob cada condição foram calculadas e analisadas (figura 8).

Exemplo 7: Análise de inibição de fosforilação de VEGFR-2 e Tie-2 em células utilizando imunoprecipitação e técnica de *western blotting*

[00085] Para verificar a inibição de fosforilação de VEGFR-2 e Tie-2 pelo anticorpo direcionado a dois alvos DIG 0001, imunoprecipitação e técnica de *western blotting* foram realizadas. As células endoteliais vasculares que foram cultivadas durante 24 horas foram incubadas durante 6 horas em um meio M199 suplementado com 1% de soro fetal

bovino, e então pré-tratadas com 26,7 µg/ml de anticorpo DIG 0001 durante 30 minutos. Então, as células endoteliais vasculares foram tratadas com 10 ng/ml de VEGF e 100 ng/ml de Ang1 durante 15 minutos. Para a análise utilizando imunoprecipitação, as células endoteliais vasculares foram lavadas com PBS frio, e tratadas com 500 µl de uma solução tampão para imunoprecipitação (1% de Triton X-100, 0,5% de Nonidet P-40, 50 mM de Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 2 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de EGTA, 2 mM de EDTA, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, e 1 mM de fluoreto de sódio). Um soluto coletado com um raspador foi passado através de um injetor de calibre 26 diversas vezes, suficientemente dissolvido, e centrifugado durante 10 minutos em 12.000 g para recuperar um sobrenadante. 2 µg de anticorpo de imunoprecipitação anti-Tie-2 (R&D systems, USA) foram adicionados a 300 µg do soluto, e reagidos durante 8 horas. Então, uma proteína A/G mais agarose (Santa Cruz Biotechnology, USA) foi adicionada, e ligada ao anticorpo de imunoprecipitação. O complexo imune resultante ligado à proteína A/G mais agarose foi centrifugado, e repetidamente lavado 3 a 5 vezes com uma solução tampão. Então, um tampão de amostra SDS foi adicionado, fervido, e então centrifugado para remover um precipitado de agarose.

[00086] Para a análise utilizando a técnica de *western blotting*, as células endoteliais vasculares foram tratadas com uma solução tampão de lise (1% (w/v) SDS, 10 mM Tris (pH 7,4), 2 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de EGTA, 2 mM de EDTA, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, e 1 mM de fluoreto de sódio) para obter um soluto, e o soluto foi fervido, e centrifugado a 4°C em 10.000 g durante 5 minutos para remover um precipitado não solúvel. Um sobrenadante foi misturado com um tampão de amostra SDS, e fervido durante 10 minutos. A SDS-PAGE e a técnica de *western blotting* foram realizadas de acordo com os métodos amplamente usados na técnica, e as

amostras usadas foram as seguintes: 12% de SDS- Gel de poliacrilamida, uma membrana de PVDF (Millipore #IPVH00010, USA), um anticorpo anti-Tie-2 (abcam, Inglaterra) e um anticorpo anti-fosfotirosina (Upstate Biotechnology, USA) usado como anticorpos primários para a análise de atividades de inibição de fosforilação de Tie-2; um anticorpo anti-p44/42 (Cell Signaling technology, USA) e um anticorpo anti-fosfo p44/42 (Cell Signaling technology, USA); um anticorpo anti-AKT (Cell Signaling technology, USA) e um anticorpo anti-fosfo AKT (Cell Signaling technology, USA); um anticorpo anti-VEGFR-2 (Cell Signaling technology, USA) e um anticorpo anti-fosfo VEGFR-2 (Cell Signaling technology, USA) usado como anticorpos primários para a análise de atividades de inibição de fosforilação de VEGFR-2; um anticorpo anti-AKT (Cell Signaling technology, USA) e um anticorpo anti-fosfo AKT (Cell Signaling technology, USA); e um anticorpo IgG anti-camundongo de cabra conjugado com HRP (Santa Cruze Biotechnology, USA) e IgG anti-coelho de cabra conjugado com HRP (Santa Cruze Biotechnology, USA) usado como anticorpos secundários que se ligam a um anticorpo primário para quimiluminescência (figura 9).

Exemplo 8: Inibição de crescimento tumoral por DIG-0001 em modelo animal de glioblastoma

[00087] Para o crescimento de glioblastoma ortotópico, camundongos-macho Balb/c-nu (Japão SLC) isentos de um patógeno específico foram usados. O transplante intracerebral de glioblastoma U-87MG (2×10^5 células, American Type Culture Collection) foi realizado de acordo com métodos conhecidos. O dia seguinte ao transplante intracerebral do glioblastoma, os camundongos foram divididos em dois grupos ($n = 4$), e tratados, como exposto a seguir: (a) injeção intraperitoneal de PBS, e (b) injeção intraperitoneal de 0,5 mg/kg de DIG-0001. Todos os tratamentos foram realizados 5 vezes (Dias 15, 18, 21, 24 e 27 após a inoculação de células neoplásicas). No 29º dia após o

transplante das células neoplásicas, os camundongos foram sacrificados, seus cérebros foram removidos, e coronalmente cortados. Um fragmento foi fixado com 10% de formalina tamponada, e incorporado em formalina, e os restantes foram incorporados em um composto OCT. Um volume de tumor foi obtido ao medir um volume de um fragmento com a maior região tumoral, e calculado de acordo com a seguinte equação: $\text{Largura}^2 \times \text{Comprimento} \times 0,5$ (figura 10).

Aplicabilidade Industrial

[00088] A composição de acordo com a presente invenção pode ser usada para tratar doenças relacionadas à angiogênese, particularmente câncer.

[00089] Embora as modalidades preferidas da presente invenção tenham sido ilustradas e descritas, será entendido pelos elementos versados na técnica que alterações e outras modificações podem ser feitas sem que se abandone a invenção em seus aspectos mais amplos. Várias características da presente invenção são apresentadas nas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo direcionado a dois alvos, caracterizado pelo fato de que compreende um domínio de ligação Tie-2 de angiopoietina 2 (Ang2) fundido por meio de um ligante à região N-terminal da cadeia leve de um anticorpo direcionado a VEGFR2, em que o referido anticorpo direcionado a dois alvos é codificado por uma sequência conforme estabelecida em SEQ ID NO: 6.

2. DNA, caracterizado pelo fato de que codifica o anticorpo direcionado a dois alvos como definido na reivindicação 1, conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6.

3. Vetor de expressão recombinante, caracterizado pelo fato de que contém o DNA como definido na reivindicação 2.

4. Método para produzir um anticorpo direcionado a dois alvos ou scFv como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

incubar uma célula hospedeira transformada com o vetor de expressão recombinante como definido na reivindicação 3; e

isolar um anticorpo direcionado a dois alvos ou scFv de uma solução de cultura da célula hospedeira.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo direcionado a dois alvos ou scFv é adicionalmente purificado utilizando cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) com uma coluna de afinidade de proteína A, uma coluna de SP-sefarose e uma cromatografia de exclusão por tamanho.

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo direcionado a dois alvos ou scFv, como definido na reivindicação 1.

7. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que é para uso em um método de tratamento de uma doença relacionada à angiogênese.

8. Composição farmacêutica para uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a doença relacionada à angiogênese é selecionada a partir do grupo que consiste em câncer, degeneração macular relacionada à idade, artrite reumatoide, retinopatia diabética, psoríase, e inflamação crônica.

9. Composição farmacêutica para uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o câncer é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de pulmão, câncer de tireoide, câncer de mama, câncer cervical, câncer de cólon, câncer pancreático, câncer retal, câncer colo-retal, câncer de próstata, câncer renal, melanoma, câncer metastático ósseo do câncer de próstata, câncer ovariano, e câncer no sangue.

FIG. 1

CCAGCGGTGTGGGTTCC

*Bst*XI

hAng2
(F281-F496)

TTCAGAGAC TGTGCTGAAGTATTCAAATCAGGACACACCACGAATGGCATCTA
CACGTTAACATTCCCTAATTCTACAGAAGAGATCAAGGCCTACTGTGACATGG
AAGCTGGAGGAGGCGGGTGGACAATTATTCAGCGACGTGAGGATGGCAGCGTT
GATTTTCAGAGGACTTGGAAAGAATATAAAGTGGGA TTTGGTAACCTTCAG
GAGAATATTGGCTGGGAAATGAGTTTGTTCGCAACTGACTAATCAGCAACGC
TATGTGCTTAAAATACACCTTAAAGACTGGGAAGGGAATGAGGCTTACTCAT
TGTATGAACATTTCTATCTCTCAAGTGAAGAACTCAATTATAGGATTCACCT
TAAAGGACTTACAGGGACAGCCGGCAAAATAAGCAGCATCAGCCAACCAGGAA
ATGATTTTAGCACAAAGGATGGAGACAACGACAAATGTATCTGCAAATGTTT
ACAAATGCTAACAGGAGGCTGGTGGTTTGATGCATGTGGTCCTTCCAACCTGA
ACGGAATGTACTATCCACAGAGGCAGAACACAAATAAGTTCAACGGCATTAAA
TGGTACTACTGGAAAGGCTCAGGCTATTCGCTCAAGGCCACAACCATGATGAT
CCGACCAGCAGATTTC

TCAGGAGGCGGAGGTAGTGGCGGAGGAGGCTCCGGTTCC

Ligante

6A6 VL

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCCTCAGTGTCAGTGTCCTCCAGGAAAGACGGC
CAGGATCACTTGTAGGGGAGATAACCTTGGAGATGTAAATGTTTACTGGTACC
AGCAGCGGCCAGGCCAGGCCCC TGTATTGGTCATGTATTATGATGCCGACCGGC
CCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACAC
TGACCATCAGCGGAGTCGAAGCCGGGATGAGGCCGACTACTATTGTCAGGTG
TGGGATAGGACTAGTGAGTATGTCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTCACCGTCTT
AGGT

GGAGGAGCCAGCCTCGTGG

*Bst*XI

FIG. 2

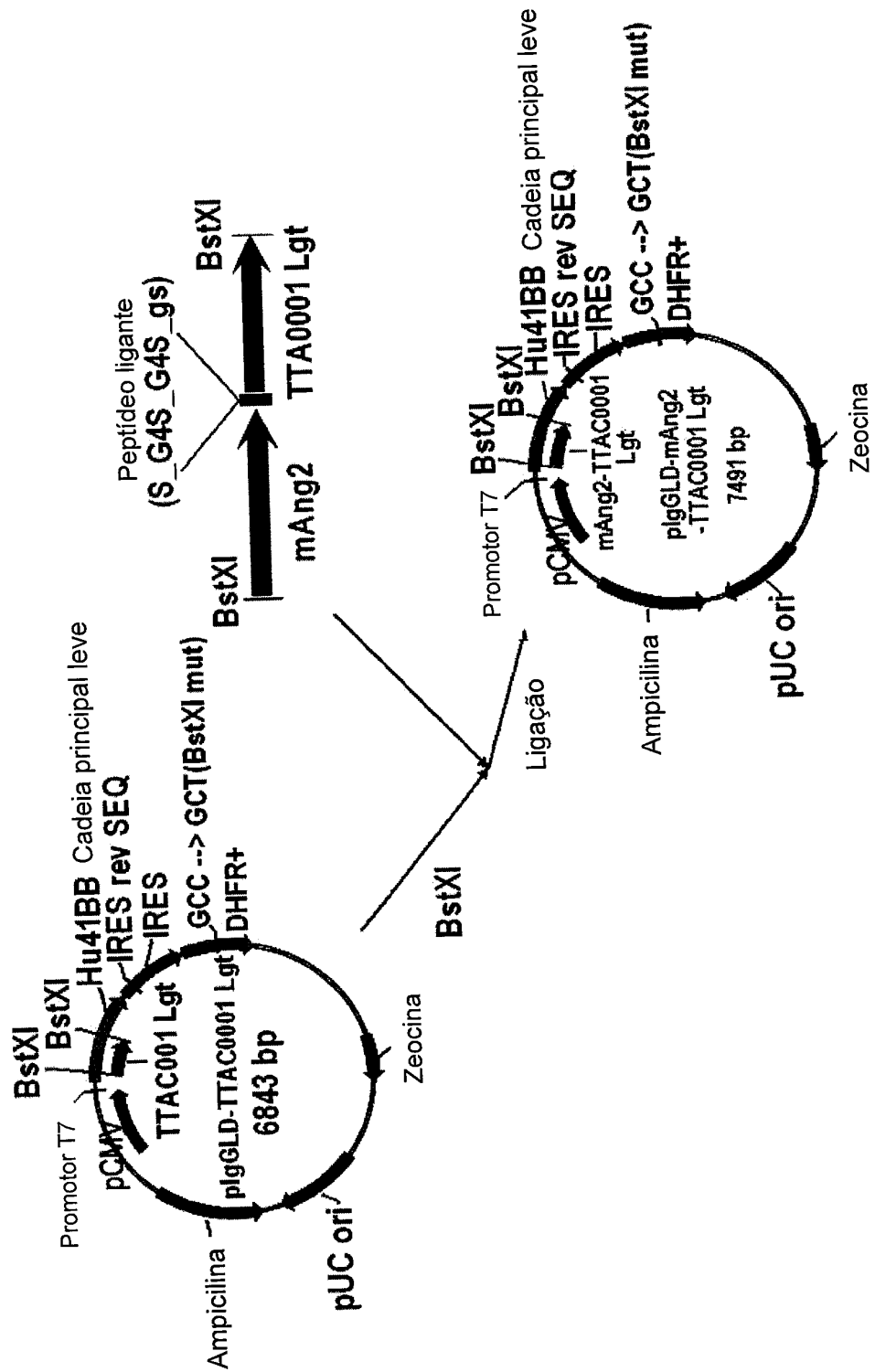


FIG. 3

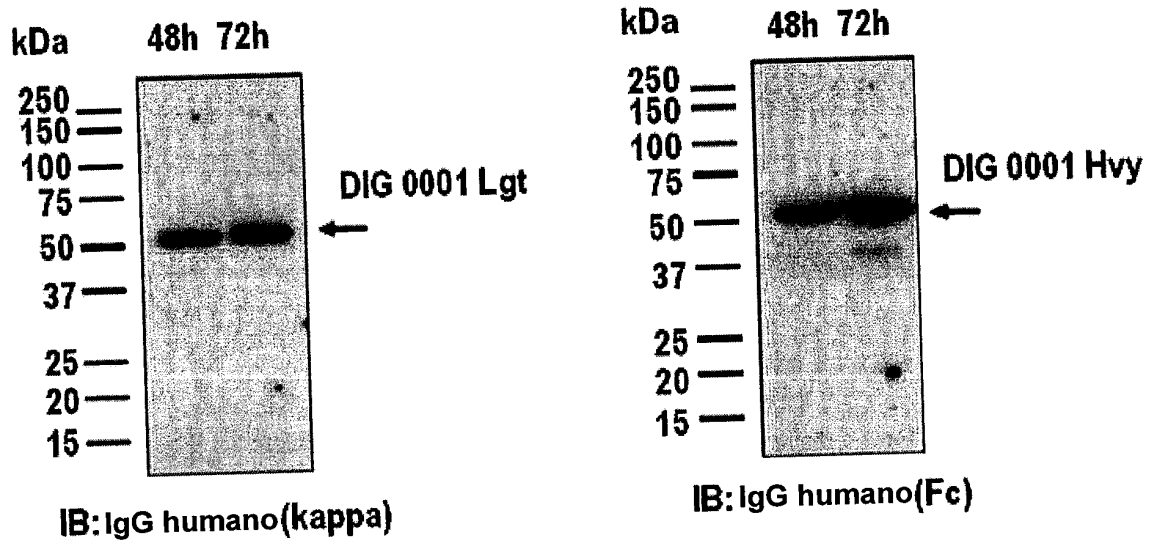


FIG. 4

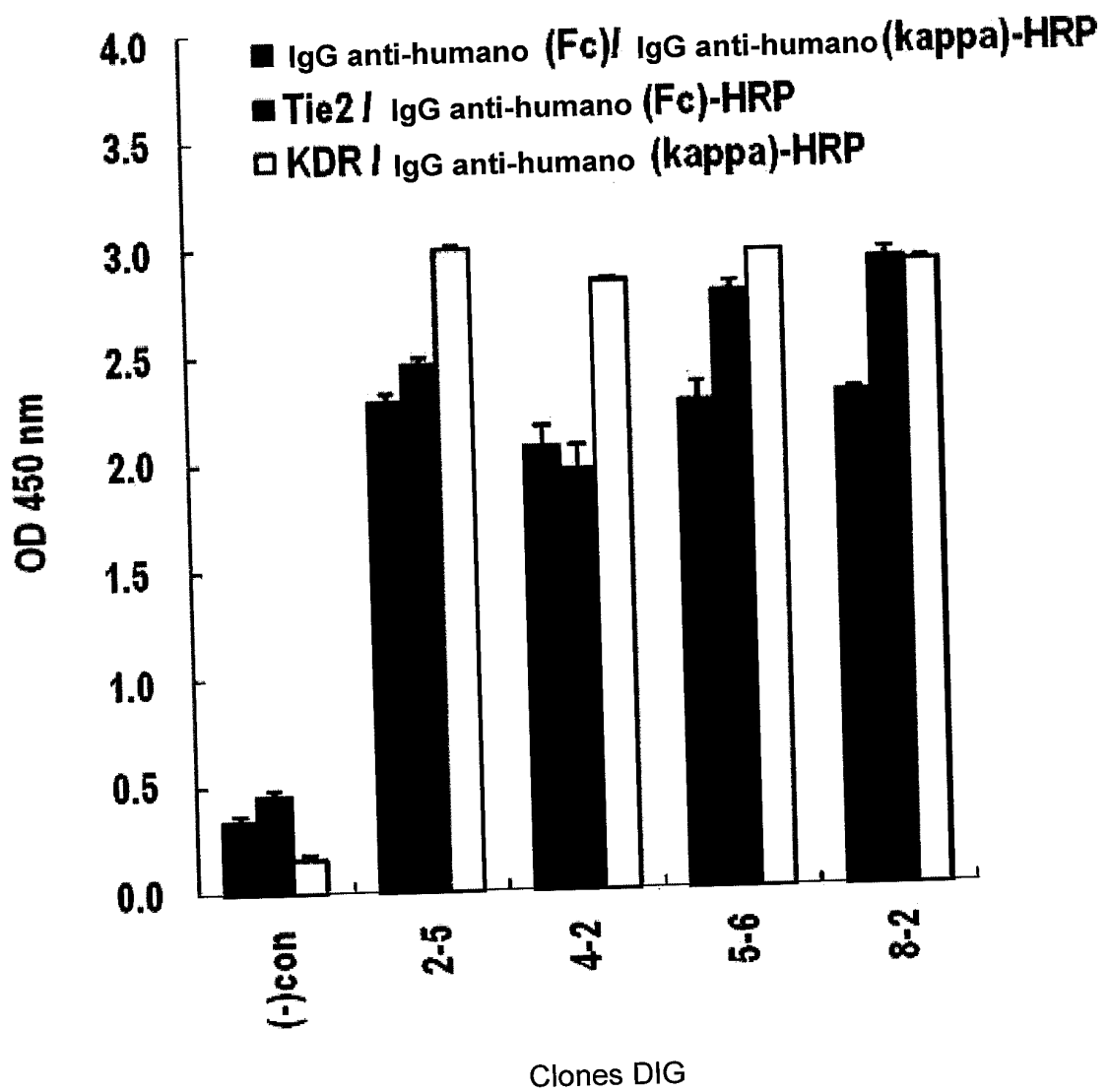


FIG. 5

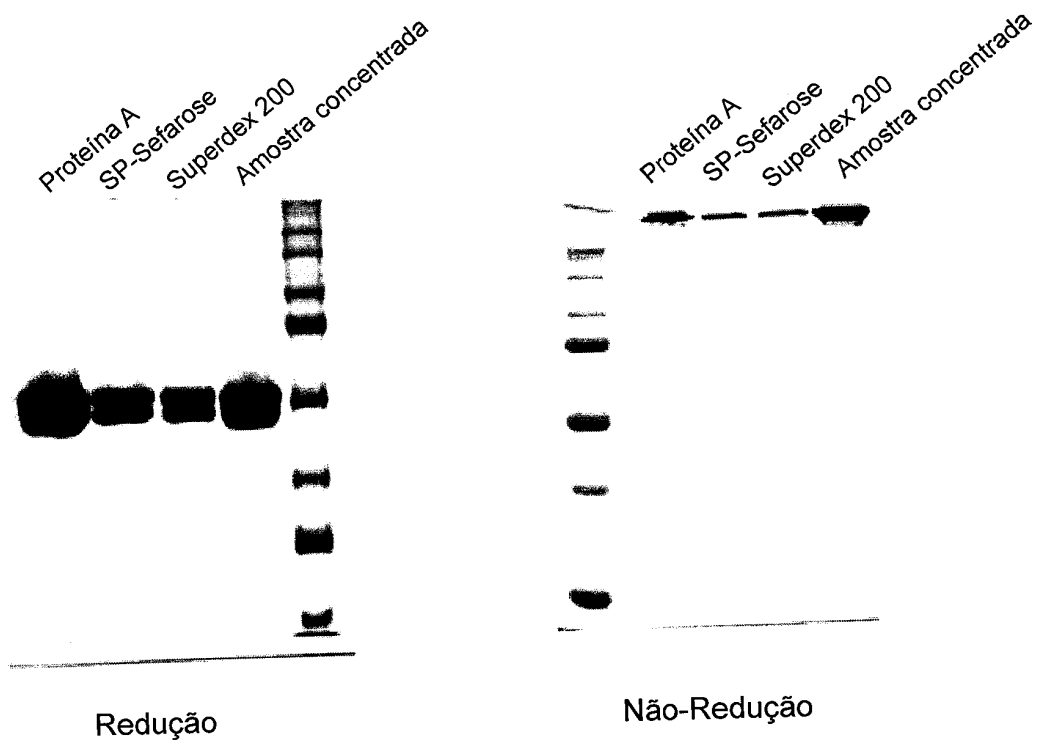
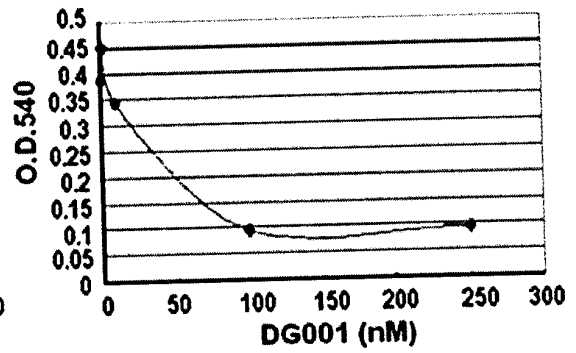
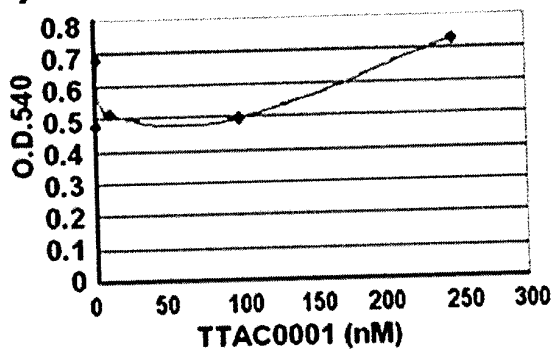


FIG. 6

1) VEGF 165 Revestimento



2) Ang2-Fc Revestimento

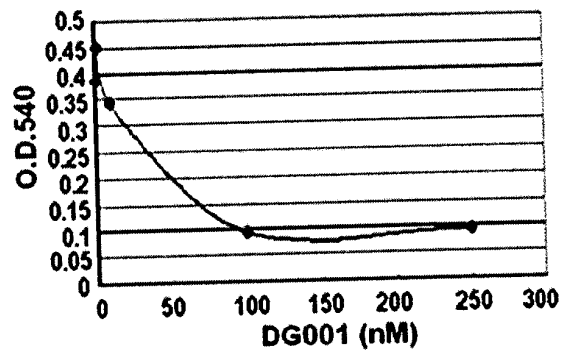
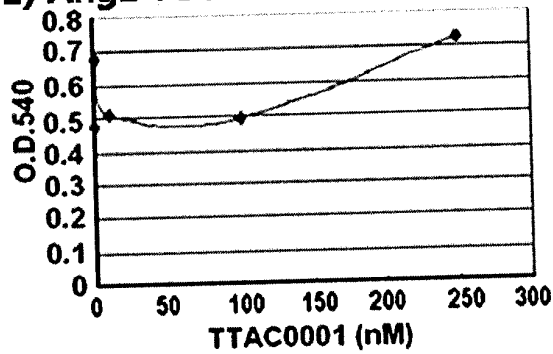


FIG. 7

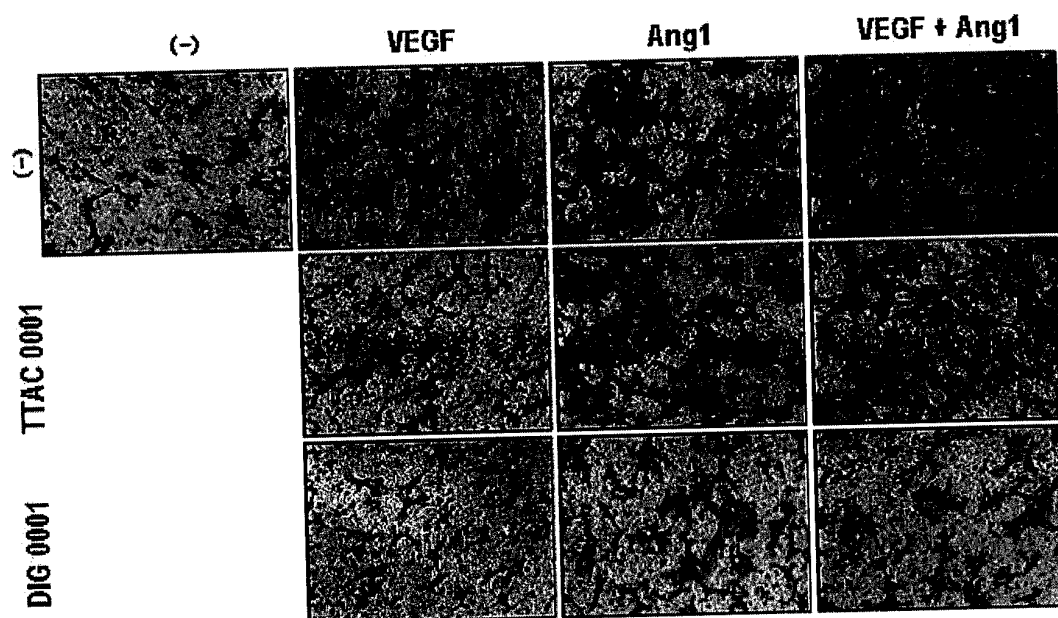
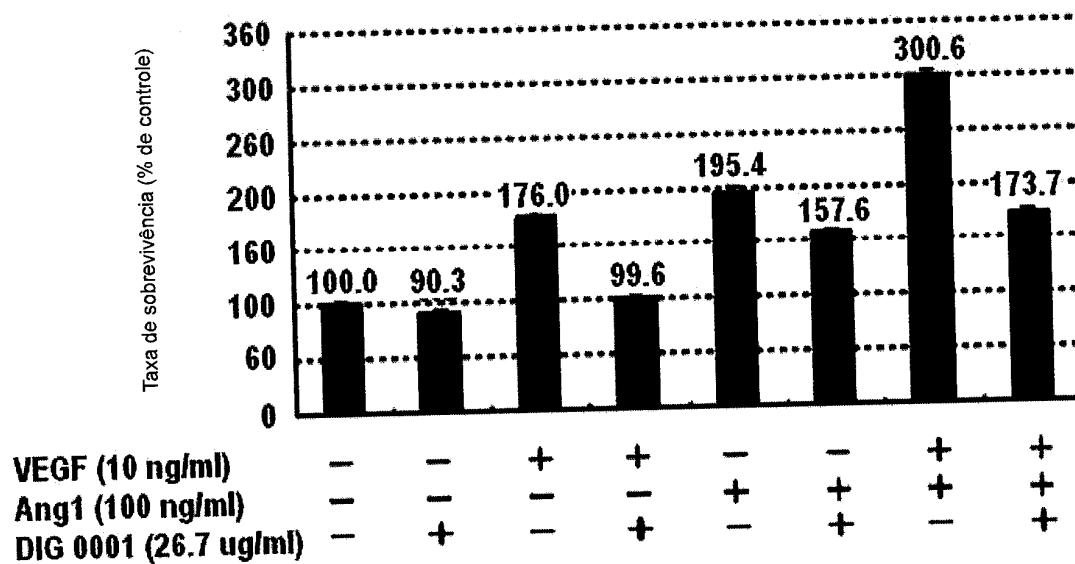


FIG. 8

FIG. 9

1) Análise de inibição de fosforilação de Tie-2

VEGF	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Ang1	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
TTAC 0001	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
DIG 0001	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

		IB: pY
		IP: Tie2
		IB: Tie2
		IP: Tie2
		P - p44/42 (T202/Y204)
		p44/42
		P - AKT (S473)
		AKT

2) Análise de inibição de fosforilação de KDR

VEGF	-	-	-	+	+	+
TTAC 0001	-	+	-	-	+	-
DIG 0001	-	-	+	-	-	+

	p-KDR (Y1 175)
	KDR
	p-p44/42 (T202/Y204)
	p44/42

FIG. 10

