

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

(21) **PI0806414-8 A2**

(22) Data de Depósito: 30/01/2008
(43) Data da Publicação: 06/09/2011
(RPI 2122)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/395
A61K 45/06
A61K 31/282
A61K 31/337
A61K 38/19
A61P 35/00

(54) **Título:** MÉTODO PARA TRATAMENTO DE TUMOR

(30) **Prioridade Unionista:** 01/02/2007 US 60/887,688

(73) **Titular(es):** Genentech, Inc.

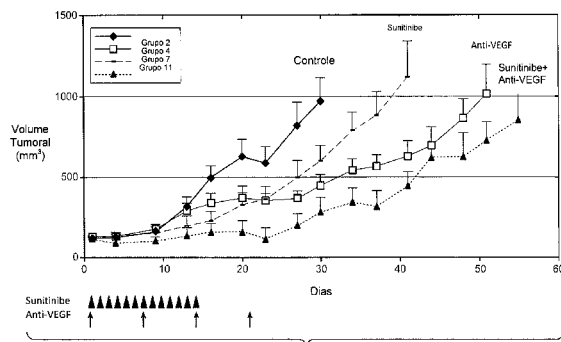
(72) **Inventor(es):** Gregory D. Plowman, ROBERT D. MASS

(74) **Procurador(es):** Paola Calabria Mattioli

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2008052406 de 30/01/2008

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/094969 de 07/08/2008

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA TRATAMENTO DE TUMOR. São divulgados no presente pedido métodos para tratamento de tumores usando-se uma combinação de terapia com inibidores da angiogênese.





“MÉTODO PARA TRATAMENTO DE TUMOR”

Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório de Patente US 60/887.688, depositado em 01 de fevereiro de 2007, cuja divulgação deste é integralmente incorporada ao presente pedido como referência.

5

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O desenvolvimento de um sistema vascular é uma necessidade fundamental para muitos processos fisiológicos e patológicos. O crescimento ativo dos tecidos, como embriões e tumores, exige suprimento adequado de sangue. Eles satisfazem esta necessidade produzindo fatores pró-angiogênicos, os quais promovem a formação de novos vasos sanguíneos através de um processo chamado angiogênese. A formação do tubo vascular é um evento complexo, porém biologicamente ordenado, envolvendo todas ou muitas das seguintes etapas: a) Células endoteliais (ECs) se proliferam a partir de ECs existentes ou se diferenciam a partir de células progenitoras; b) ECs migram e se juntam para formar estruturas similares a um cordão; c) os cordões vasculares então se submetem à tubulogênese para formar vasos com um lúmen central d) os cordões ou vasos existentes enviam brotos para formar vasos secundários; e) o plexo vascular primitivo se submete também à reconstrução e transformação; e f) células periendoteliais são recrutadas para revestir os tubos endoteliais, fornecendo manutenção e funções de modulação para os vasos; tais células incluindo, pericitos para capilares pequenos, células musculares lisas para vasos maiores e células do miocárdio no coração. Hanahan, D. *Science* 277:48-50 (1997); Hogan, B. L. & Kolodziej, P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3:513-23 (2002); Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. *Cell*. 112:19-28 (2003).

Atualmente está bem estabelecido que a angiogênese esteja envolvida na patogênese de diversas disfunções. Isto inclui tumores sólidos e metástases, arterioesclerose, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamação

crônica, doenças neovasculares intra-oculares como retinopias proliferativas, por exemplo, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade (AMD), glaucoma neovascular, rejeição imune de tecido da córnea transplantado e outros tecidos, artrite reumatóide e psoríase. Folkman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-239 (1991) e Garner A., "Vascular diseases", Em: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A., Klintworth GK, eds., 2ª Edição (Marcel Dekker, NY, 1994), páginas 1625-1710.

No caso de crescimento tumoral, a angiogênese parece ser crucial para a transição da hiperplasia para neoplasia, e para fornecer alimento para o crescimento e para a metástase do tumor. Folkman *et al.*, *Nature* 339:58 (1989). A neovascularização permite que as células tumorais adquiram uma vantagem no crescimento e autonomia proliferativa comparadas às células normais. Um tumor usualmente se inicia como uma única célula anormal, que pode se proliferar apenas para um tamanho de poucos milímetros cúbicos, devido à distância dos leitos capilares disponíveis, e pode ficar "dormente", sem crescimento adicional e disseminação, por um longo período de tempo. Algumas células tumorais mudam então para o fenótipo angiogênico, para ativar as células endoteliais, que se proliferam e amadurecem para novos vasos capilares sanguíneos. Esses novos vasos sanguíneos formados, não somente permitem o crescimento continuado do tumor primário, como também a disseminação e recolonização de células tumorais metastáticas. Consequentemente, observou-se uma correlação entre a densidade dos microvasos nos cortes de tumor e a sobrevivência dos pacientes com câncer de mama, bem como em diversos outros tumores. Weidner *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 324:1-6 (1991); Horak *et al.*, *Lancet* 340:1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, *Lancet* 340:145-146 (1992). O mecanismo preciso que controla a troca para angiogênese não é bem conhecido, mas acredita-se que a

neovascularização da massa tumoral resulte da rede equilibrada de uma grande quantidade de estimuladores e inibidores da angiogênese (Folkman, 1995, *Nat Med* 1 (1):27-31).

O processo de desenvolvimento vascular é estreitamente regulado. Até hoje, um número significativo de moléculas, a maioria de fatores secretados produzidos por células adjacentes, mostraram regular a diferenciação da EC, proliferação, migração e união das estruturas similares a cordões. Por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi identificado como o fator chave envolvido no estímulo da angiogênese e na indução da permeabilidade vascular. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.* 18:4-25 (1997). A descoberta de que a perda de até mesmo um único alelo do VEGF resulta na letalidade embrionária, aponta para um papel insubstituível, desempenhado por este fator no desenvolvimento e diferenciação do sistema vascular. Além disso, o VEGF mostrou ser um mediador chave na neovascularização associada com tumores e disfunções intra-oculares. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.* acima. O mRNA do VEGF é superexpresso pela maioria dos tumores humanos examinados. Berkman *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.*, *Brit. J. Cancer* 73:931-934 (1996); Dvorak *et al.*, *Am. J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995).

Anticorpos que neutralizam o anti-VEGF suprimem o crescimento de uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas em camundongos nus (Kim *et al.*, *Nature* 362:841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) e também inibem a angiogênese intraocular em modelos de disfunções isquêmicas da retina. Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996). Então, anticorpos monoclonais anti-VEGF ou outros inibidores da ação do VEGF são candidatos promissores para o

tratamento de tumores e várias disfunções neovasculares intraoculares. Tais anticorpos são descritos, por exemplo, na patente EP 817.648, publicada em 14 de janeiro de 1998; e no documento WO98/45331 e documento WO 98/45332, ambos publicados em 15 de outubro de 1998.

5 Apesar dos avanços significativos no tratamento de câncer alcançado pelos inibidores da angiogênese como anticorpo anti-VEGF, ainda se busca terapias aprimoradas, especialmente aquelas que aumentam ainda a eficácia geral.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

10 A presente invenção fornece terapias de combinação para tratar tumores, em que um antagonista do VEGF é combinado com um inibidor de proteína quinase que tem pelo menos uma atividade de bloqueio PDGFR, produzindo com isso atividades antitumor. Em certas realizações, o antagonista do VEGF é um composto que interfere na ligação do VEGF a um
15 receptor celular. Exemplos de tais antagonistas que bloqueiam o VEGF incluem, mas não se limitam a, receptores do VEGF solúvel, aptâmeros ou corpos peptídicos que são específicos para o VEGF, e anticorpos anti-VEGF. Em uma realização, o anticorpo anti-VEGF é bevacizumabe.

 Em um aspecto, o inibidor de proteína quinase é específico para
20 PDGFR. Em outros aspectos, o inibidor de proteína quinase atinge RTKs múltiplos, incluindo PDGFR e VEGFR-2, com isso bloqueando tanto as vias do PDGF como VEGF. Em um aspecto, o inibidor de proteína quinase é sunitinibe (SUTENT®).

 Métodos da invenção podem ser usados para tratar diferentes
25 cânceres, tanto tumores sólidos como tumores de tecido macio similar. Exemplos não limitantes de cânceres que são receptivos ao tratamento da invenção incluem câncer de mama, câncer colorretal, câncer de pulmão de células não-pequenas, linfoma não-Hodgkin (NHL), câncer de célula renal,

câncer de próstata, câncer de fígado, câncer pancreático, sarcoma de tecidos moles, sarcoma de kaposi, carcinoma carcinóide, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer ovariano, mesotelioma e mieloma múltiplo. Em certos aspectos os cânceres são metastáticos. Em outros aspectos, os cânceres são não-metastáticos.

Em certas realizações, bevacizumabe e sunitinibe são usados em terapias de combinação para câncer como carcinoma de célula renal, carcinoma de pulmão de células não-pequenas, carcinoma colorretal, carcinoma de mama ou carcinoma pancreático. Em certas realizações, quando usado em combinação, bevacizumabe é administrado na faixa de cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 15 mg/kg. Em uma realização, uma ou mais doses de cerca de 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg, 10 mg/kg ou 15 mg/kg (ou qualquer combinação destas) podem ser administradas ao sujeito. Tais doses podem ser administradas intermitentemente, por exemplo, todo dia, a cada três dias, toda semana ou a cada duas ou três semanas. Em outra realização, quando usados em combinação, bevacizumabe é administrado ao sujeito intravenosamente a 10 mg/kg em semanas alternadas ou 15mg/kg a cada três semanas, e sunitinibe é administrado ao sujeito oralmente em uma dose diária de cerca de 25 mg a cerca de 50 mg por 1 a 4 semanas seguido por 1 a 2 semanas de pausa. Em ainda outra realização, sunitinibe é administrado a 25 mg/dia por 2 semanas seguido por 1 semana de pausa.

Dependendo da indicação específica de câncer a ser tratado, a combinação de terapia da invenção pode ser combinada com agentes terapêuticos adicionais, como agentes quimioterapêuticos ou terapias adicionais como radioterapia ou cirurgia. Muitos agentes quimioterapêuticos podem ser usados na combinação de terapia da invenção. Em certas realizações, a combinação de terapia da invenção pode ser combinada com um

ou mais agentes quimioterapêuticos. Em uma realização, a combinação de terapia da invenção é combinada com o agente quimioterapêutico paclitaxel. Em outra realização, a combinação de terapia da invenção é combinada com agentes quimioterapêuticos carboplatina e paclitaxel. Em certas realizações, serão usados estes agentes quimioterapêuticos que são padrão para o tratamento das indicações específicas. Em outra realização, a dosagem ou a frequência de cada agente terapêutico a ser usado na combinação é a mesma, ou menor que a dosagem ou frequência do agente correspondente quando usado sem outro(s) agente(s).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As figuras 1A e 1B representam a inibição do crescimento de xenoenxertos de carcinoma de cólon humano LS174T estabelecidos em camundongos nus atímicos (n=10 para cada grupo). A programação para administração de sunitinibe e anti-VEGF (o MAb B20-4.1) são indicadas por pontas de flecha e flechas, respectivamente. Consulte Exemplo 1 para detalhes de dosagem. A figura 1B é uma plotagem Kaplan-Meier indicando a sobrevida.

As figuras 2A e 2B representam a inibição do crescimento de xenoenxertos de carcinoma de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) H1299 estabelecidos em camundongos nus atímicos (n=10 para cada grupo). A figura 2B é uma plotagem Kaplan-Meier indicando a sobrevida.

A figura 3 mostra o resultado de outro estudo de inibição do crescimento de xenoenxerto H1299 (n=10 para cada grupo). Duas doses diferentes de sunitinibe foram usadas tanto para monoterapia como para combinação. Consulte Exemplo 1 para detalhes de dosagem.

A figura 4A representa a inibição do crescimento de xenoenxertos de carcinoma de célula renal (RCC) 786-O em camundongos nus atímicos (n=10 para cada grupo).

As figuras 5A e 5B representam a inibição do crescimento de xenoenxertos de carcinoma pancreático humano Bx-PC3 em camundongos nus atímicos (n=10 para cada grupo). Duas doses diferentes de sunitinibe foram usadas tanto para monoterapia como para combinação. Consulte Exemplo 1 para detalhes de dosagem. A figura 5B é uma plotagem Kaplan-Meier indicando a sobrevida.

A figura 6 representa a inibição do crescimento de xenoenxertos de carcinoma de célula renal (RCC) Caki-2 estabelecidos em camundongos SCID (n=10 para cada grupo). Duas doses diferentes de sunitinibe foram usadas tanto para monoterapia como para combinação. Consulte Exemplo 1 para detalhes de dosagem.

As figuras 7A e 7B resumem e comparam a inibição do crescimento dos xenoenxertos Caki-2 RCC (7A) e dos xenoenxertos H1299 NSCLC (7B). Em cada figura, apenas os resultados de dose baixa de sunitinibe são mostrados. Consulte Exemplo 1 para detalhes de dosagem.

As figuras 8A-C ilustram as alterações morfológicas dos tumores em xenoenxertos H1299 NSCLC tratados. 8A mostra os graus de necrose tumoral mediante diferentes tratamentos. As porcentagens de necrose são medidas por coloração H&E; 8B representa as alterações da densidade vascular mediante diferentes tratamentos, conforme medido por PECAM IHC; e 8C mostra o tumor e a vasculatura do tumor em um xenoenxerto H1299 tratado com anti-VEGF (B20-4.1) e combinação com sunitinibe.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

Para os propósitos de interpretação deste relatório descritivo, as definições a seguir adotarão, e sempre que apropriado, termos usados no singular que também incluem a forma plural e vice-versa. No caso de qualquer definição apresentada abaixo entrar em conflito com qualquer documento

incorporado no presente pedido como referência, a definição abaixo predominará.

O termo "VEGF" ou "VEGF-A" é usado para se referir ao fator de crescimento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos e fatores de crescimento celular endotelial vascular humanos relacionados de 121, 189 e 206 aminoácidos, conforme descrito por Leung *et al. Science*, 246:1306 (1989), e Houck *et al. Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991), junto com as formas alélicas de ocorrência natural e formas processadas destes. VEGF-A é parte de uma família de gene que inclui VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e PIGF. VEGF-A se liga principalmente a dois receptores tirosina quinase de alta afinidade, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1/KDR), o último sendo o principal transmissor de sinais mitogênicos celulares endoteliais vasculares de VEGF-A. Adicionalmente, a neuropilina-1 foi identificada como um receptor para isoformas VEGF-A de ligação de heparina, e podem desempenhar uma função no desenvolvimento vascular. Os termos "VEGF" ou "VEGF-A" também se referem aos VEGFs de espécies não humanas, como camundongo, rato ou primata. Algumas vezes o VEGF de uma espécie específica é indicado por termos como hVEGF para VEGF humano ou mVEGF para VEGF murino. O termo "VEGF" é também usado para se referir a formas ou fragmentos truncados do polipeptídeo que compreende 8 a 109 ou 1 a 109 aminoácidos do fator de crescimento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos. Referências para qualquer uma destas formas de VEGF podem ser identificadas no presente pedido por, por exemplo, como "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" ou "VEGF₁₆₅." As posições de aminoácidos para um VEGF nativo "truncado" estão numeradas conforme indicado na sequência do VEGF nativo. Por exemplo, a posição de aminoácido 17 (metionina) no VEGF nativo truncado também é a posição 17 (metionina) no VEGF nativo. O VEGF nativo truncado tem afinidade de ligação para os receptores KDR e Flt-1 comparável

ao VEGF nativo.

O termo “VEGF variante”, como usado no presente pedido, refere-se a um polipeptídeo VEGF que inclui uma ou mais mutações de aminoácidos na sequência do VEGF nativo. Opcionalmente, uma ou mais mutações de aminoácido inclui(em) substituição(ões) de aminoácido(s). Para os propósitos de abreviações na designação de VEGF variantes descritos no presente pedido, nota-se que números se referem à posição do resíduo de aminoácido ao longo da sequência de aminoácidos do suposto VEGF nativo (fornecido em Leung *et al.*, acima e Houck *et al.*, acima.).

Um polipeptídeo de “sequência nativa” compreende um polipeptídeo que possui a mesma sequência de aminoácido que aquela derivada da natureza. Dessa forma, um polipeptídeo de sequência nativa pode ter a sequência de aminoácido de um polipeptídeo de ocorrência natural de qualquer mamífero. Tal polipeptídeo de sequência nativa pode ser isolado da natureza ou pode ser produzido por meios recombinantes ou sintéticos. O termo polipeptídeo de “sequência nativa” especificamente abrange formas truncadas ou secretadas de ocorrência natural do polipeptídeo (por exemplo, uma sequência de domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (por exemplo, formas unidas alternativamente) e variantes alélicas do polipeptídeo de ocorrência natural.

Um polipeptídeo “variante” significa um polipeptídeo biologicamente ativo que tem pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácido com o polipeptídeo de sequência nativa. Tais variantes incluem, por exemplo, polipeptídeos em que um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados ou deletados no N ou C- terminal do polipeptídeo. Geralmente, um variante terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácido, pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácido ou pelo menos cerca de 95% ou mais de identidade de sequência

de aminoácido com o polipeptídeo de sequência nativa.

“Atividade biológica do VEGF” inclui ligação a qualquer receptor do VEGF ou qualquer atividade de sinalização do VEGF como regulação, tanto da angiogênese normal como anormal, e vasculogênese (Ferrara e Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543); promoção da vasculogênese embrionária e angiogênese (Carmeliet *et al.* (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara *et al.* (1996) *Nature* 380:439-442); e modulação da proliferação cíclica dos vasos sanguíneos no trato reprodutivo de fêmeas e do crescimento ósseo e formação de cartilagem (Ferrara *et al.* (1998) *Nature Med.* 4:336-340; Gerber *et al.* (1999) *Nature Med.* 5:623-628). Além de ser um fator angiogênico na angiogênese e vasculogênese, o VEGF, como um fator de crescimento pleiotrópico, exibe múltiplos efeitos biológicos em outros processos fisiológicos, como sobrevivência de células endoteliais, vasodilatação e permeabilidade dos vasos, quimiotaxia de monócitos e influxo de cálcio (Ferrara e Davis-Smyth (1997), acima e Cebe-Suarez *et al.* *Cell. Mol. Life Sci* 63:601-615 (2006)). Além disso, estudos recentes relataram os efeitos mitogênicos do VEGF em alguns tipos celulares não endoteliais, como células epiteliais de pigmento retinal, células do duto pancreático e células de Schwann. Guerrin *et al.* (1995) *J. Cell Physiol.* 164:385-394; Oberg-Welsh *et al.* (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132; Sondell *et al.* (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740.

Um “inibidor da angiogênese” ou “agente antiangiogênese” refere-se a uma substância de peso molecular pequeno, um polinucleotídeo, um polipeptídeo, uma proteína isolada, uma proteína recombinante, um anticorpo, ou proteínas de fusão ou conjugadas destes, que inibem a angiogênese, vasculogênese ou permeabilidade vascular, tanto diretamente como indiretamente. Deve-se entender que os agentes antiangiogênese incluem aqueles agentes que ligam e bloqueiam a atividade do fator angiogênico ou seu

receptor. Por exemplo, um agente antiangiogênese é um anticorpo ou outro antagonista para um agente angiogênico conforme definido acima, por exemplo, anticorpos para VEGF-A ou para os receptores de VEGF-A (por exemplo, receptor KDR ou receptor Flt-1), inibidores anti-PDGFR como

5 GLEEVEC® (Mesilato de Imatinibe). Agentes antiangiogênese também incluem inibidores de angiogênese nativos, por exemplo, endostatina, etc. Consulte, por exemplo, Klagsbrun e D'Amore *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit e Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por exemplo, Tabela 3 listando terapia antiangiogênica em melanoma maligno); Ferrara & Alitalo,

10 *Nature Medicine* 5:1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por exemplo, Tabela 2 listando fatores angiogênicos); e Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por exemplo, Tabela 1 listando agentes antiangiogênicos usados em testes clínicos).

Um "antagonista do VEGF" refere-se a uma molécula (peptidil ou

15 não peptidil) capaz de neutralizar, bloquear, inibir, anular, reduzir ou interferir nas atividades do VEGF, incluindo sua ligação a um ou mais receptores do VEGF. Em certas realizações, o antagonista do VEGF reduz ou inibe pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais, do nível de expressão ou atividade biológica do VEGF. Em outra realização, o VEGF

20 inibido pelo antagonista do VEGF é VEGF (8-109), VEGF (1-109) ou VEGF₁₆₅. Antagonistas do VEGF úteis nos métodos da invenção incluem compostos peptidil ou não peptidil que se ligam especificamente ao VEGF, como anticorpos anti-VEGF e fragmentos de ligação de antígeno destes, polipeptídeos ou fragmentos destes que se ligam especificamente ao VEGF; e

25 receptores de moléculas e derivados que se ligam especificamente ao VEGF, com isso sequestrando sua ligação para um ou mais receptores (por exemplo, proteínas receptoras do VEGF solúvel ou fragmentos destes de ligação do VEGF, ou proteínas receptoras quiméricas do VEGF); oligômeros de

nucleobase *antisense* complementares a pelos menos um fragmento de uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo VEGF; RNAs pequenos complementares a pelos menos um fragmento de uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo VEGF; ribozimas que atingem o VEGF; corpos peptídicos para VEGF; e aptâmeros de VEGF.

Um “anticorpo anti-VEGF” é um anticorpo que se liga ao VEGF com afinidade e especificidade suficientes. O anticorpo selecionado terá normalmente uma forte afinidade de ligação para o VEGF, por exemplo, o anticorpo pode se ligar ao hVEGF com um valor K_d entre 100 nM a 1 pM.

Afinidades de anticorpo podem ser determinadas pelo teste de ressonância plasmônica de superfície (tcomo o teste BIAcore, conforme descrito na Publicação de Pedido PCT documento WO 2005/012359); teste imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) e testes de competição (como RIA's), por exemplo. Em certas realizações, o anticorpo anti-VEGF da invenção pode ser usado como um agente terapêutico no direcionamento e interferência em doenças ou condições em que a atividade do VEGF esteja envolvida. Também, o anticorpo pode ser submetido a outros testes de atividade biológica, por exemplo, com o objetivo de avaliar sua efetividade como um terapêutico. Tais testes são conhecidos na técnica e dependem do antígeno alvo e uso pretendido para o anticorpo. Exemplos incluem o teste de inibição HUVEC (conforme descrito nos Exemplos abaixo); testes de inibição de crescimento de célula tumoral (conforme descrito no documento WO 89/06692, por exemplo); testes de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade mediada por complemento (CDC) (patente US 5.500.362); e atividade agonística ou testes hematopoiéticos (ver documento WO 95/27062).

Um anticorpo anti-VEGF usualmente não se ligará a outro VEGF homólogo, como VEGF-B ou VEGF-C, nem a outros fatores de crescimento, como PIGF, PDGF ou bFGF.

Em certas realizações, os anticorpos anti-VEGF incluem um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epítipo do anticorpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1, produzido pelo hibridoma ATCC HB 10709, um anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante, gerado de acordo com

5 Presta *et al. Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997). Em uma realização, o anticorpo anti-VEGF é “Bevacizumabe (BV)”, também conhecido como “rhuMAb VEGF” ou “AVASTIN®”. Ele compreende regiões de estrutura de IgG1 humana mutadas e regiões determinantes de complementaridade de ligação de antígeno do A4.6.1, anticorpo monoclonal anti-hVEGF murino, que bloqueia a ligação do VEGF

10 humano aos seus receptores. Aproximadamente 93% da sequência de aminoácido de Bevacizumabe, incluindo a maioria das regiões de estrutura, é derivada da IgG1 humana, e cerca de 7% da sequência é derivada do anticorpo A4.6.1. murino. Bevacizumabe tem um peso molecular de aproximadamente 149.000 daltons e é glicosilado. Bevacizumabe foi aprovado pelo FDA para uso

15 em combinação com um regime de quimioterapia para tratar câncer colorretal metastático (CRC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC). Hurwitz *et al., N. Engl. J. Med.* 350:2335-42 (2004); Sandler *et al., N. Engl. J. Med.* 355:2542-50 (2006). Atualmente, bevacizumabe está sendo investigado em muitos testes clínicos em andamento para tratar várias indicações de câncer.

20 Kerbel, *J. Clin. Oncol.* 19:45S-51S (2001); De Vore *et al, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19:485a. (2000); Hurwitz *et al., Clin. Colorectal Cancer* 6:66-69 (2006); Johnson *et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20:315a (2001); Kabbinavar *et al. J. Clin. Oncol.* 21:60-65 (2003); Miller *et al., Breast Can. Res. Treat.* 94:Suppl 1:S6 (2005).

25 Bevacizumabe e outros anticorpos anti-VEGF humanizados estão ainda descritos na patente US 6.884.879, emitida em 26 de fevereiro de 2005. Anticorpos adicionais incluem os anticorpos da série G6 ou B20 (por exemplo, G6-31, B20-4.1), conforme descrito na Publicação de Pedido PCT

documento WO 2005/012359, Publicação de Pedido PCT documento WO 2005/044853, e Pedido de Patente 60/991.302, o conteúdo destes pedidos de patente é expressamente incorporado ao presente pedido como referência. Para anticorpos adicionais consultar patentes US 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020, 6.054.297; documento WO 96/03430, documento WO 96/30046; documento WO94/10202; patente EP 30046/00195; ou Publicações de Pedidos de Patentes US 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, and 20050112126 e Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004). Outros anticorpos incluem aqueles que se ligam a um epítipo funcional no VEGF humano que compreende os resíduos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, e C104 or, alternativamente, que compreende os resíduos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 e Q89.

Um “anticorpo da série G6”, de acordo com esta invenção, é um anticorpo anti-VEGF que é derivado de uma sequência de um anticorpo G6 ou um anticorpo derivado de G6, de acordo com qualquer uma das Figuras 7, 24 a 26 e 34 a 35 da Publicação PCT documento WO 2005/012359, a divulgação completa destes é expressamente incorporada ao presente pedido como referência. Consulte também Publicação PCT documento WO 2005/044853, a divulgação completa desta é expressamente incorporada ao presente pedido como referência. Em uma realização, o anticorpo da série G6 se liga a um epítipo funcional no VEGF humano que compreende os resíduos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 e Q89.

Um “anticorpo da série B20”, de acordo com esta invenção, é um anticorpo anti-VEGF que é derivado de uma sequência do anticorpo B20 ou de um anticorpo derivado de B20, de acordo com qualquer uma das figuras 27 a 29 da Publicação PCT documento WO 2005/012359, a divulgação completa destes é expressamente incorporada ao presente pedido como referência. Consulte também Publicação PCT documento WO 2005/044853 e patente US

60/991.302, a divulgação completa destas é expressamente incorporada ao presente pedido como referência. Em uma realização, o anticorpo da série B20 se liga a um epítipo funcional no VEGF humano que compreende os resíduos F17, M18, D19, Y21, Q89, I91, K101, E103 e C104.

5 Um "epítipo funcional", de acordo com esta invenção, refere-se aos resíduos de aminoácidos de um antígeno que contribuem energeticamente para a ligação de um anticorpo. A mutação em qualquer um dos resíduos do antígeno que contribuem energeticamente (por exemplo, mutação do VEGF tipo selvagem por alanina ou mutação homóloga) romperá a ligação do
10 anticorpo de modo que a razão de afinidade relativa (IC_{50} mutante VEGF/ IC_{50} tipo selvagem VEGF) do anticorpo será maior que 5 (consulte Exemplo 2 do documento WO 2005/012359). Em uma realização, a razão de afinidade relativa é determinada por uma solução de ligação de exibição por fago em ELISA. Resumidamente, imunoplasacas Maxisorp com 96 poços (NUNC) são
15 revestidas durante a noite a 4°C com uma forma Fab do anticorpo a ser testado a uma concentração de 2 µg/ml em PBS, e bloqueadas com PBS, BSA a 0,5%, e Tween20 a 0,05% (PBT) por 2h em temperatura ambiente. Diluições seriais de pontos mutantes de alanina do hVEGF de exibição por fago (resíduos forma 8-109) ou hVEGF tipo selvagem (8-109) em PBT são primeiro incubados nas
20 placas revestidas com Fab por 15 min em temperatura ambiente, e as placas são lavadas com Tween20 a 0,05% (PBST). O fago ligado é detectado com um anticorpo monoclonal anti-M13 conjugado com peroxidase de rábano silvestre (Amersham Pharmacia) diluído 1:5000 em PBT, revelado com substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) por
25 aproximadamente 5 min, interrompido com H_3PO_4 1,0 M, e realizada a leitura espectrofotométrica a 450 nm. A razão dos valores IC_{50} values ($IC_{50,ala}/IC_{50,wt}$) representa o número de reduções na afinidade de ligação (a afinidade de ligação relativa).

Ao longo de todo relatório descritivo e reivindicações, a numeração dos resíduos em uma cadeia pesada da imunoglobulina é aquela do índice EU como em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), expressamente incorporada ao presente pedido como referência. O “índice EU como em Kabat” refere-se à numeração de resíduos do anticorpo IgG1 EU humano.

O termo “anticorpo” é usado no sentido mais amplo e especificamente abrange anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais inteiros), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

O “Kd” ou “valor Kd”, de acordo com esta invenção, em uma realização é medido por um teste de ligação de VEGF radiomarcado (RIA) realizado com a versão Fab de um anticorpo e um VEGF, conforme descrito pelo teste a seguir que mede afinidade de ligação da solução de Fabs para VEGF pelo equilíbrio de Fab com uma concentração mínima de antígeno (^{125}I)-marcado na presença de uma série de titulação de VEGF não marcado, capturando então o VEGF ligado com uma placa revestida com um anticorpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para estabelecer as condições para o teste, placas de microtítulo (Dynex) são revestidas durante a noite com 5 ug/ml de um anticorpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) em 50 mM de carbonato de sódio (pH 9,6), e subsequentemente bloqueado com 2% (p/v) de albumina de soro bovino em PBS por duas a cinco horas em temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). Em uma placa não absorvente (Nunc #269620), 100 pM ou 26 pM de [^{125}I]-VEGF(109) são misturados com uma série de diluições de um Fab de interesse por exemplo, Fab-12 (Presta *et al.*, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). O Fab de interesse é

então incubado durante a noite; no entanto, a incubação pode continuar por 65 horas para garantir que o equilíbrio seja alcançado. Posteriormente, as misturas são transferidas para a placa de captura para incubação em temperatura ambiente por uma hora. A solução é então removida e a placa

5 lavada oito vezes com Tween-20 a 0,1% em PBS. Quando as placas estiverem secas, 150 ul/poço de cintilante (MicroScint-20; Packard) é adicionado e as placas são contadas em um contador Topcount gamma (Packard) por dez minutos. As concentrações de cada Fab com ligação máxima menor ou igual a 20% são escolhidas para uso em testes de ligação

10 competitiva. De acordo com outra realização K_d ou valor K_d é medido pelo uso de testes de ressonância de plasmon de superfície usando-se um BIAcore™-2000 ou um BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C com chips CM5 de antígeno imobilizado a aproximadamente 10 unidades de resposta (RU). Resumidamente, chips biosensor dextrano carboximetilado

15 (CM5, BIAcore Inc.) são ativados com hidrocloreto de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS), de acordo com as instruções do fornecedor. O VEGF humano é diluído com 10mM de acetato de sódio, pH 4,8, em 5 ug/ml (aproximadamente 0,2 uM) antes da injeção, a uma taxa de fluxo de 5 ul/minuto para alcançar

20 aproximadamente 10 unidades de resposta (RU) de proteína acoplada. Seguindo a injeção de VEGF humano, 1M de etanolamina é injetado para bloquear grupos não reagidos. Para medidas cinéticas, duas diluições seriais de Fab (0,78 nM a 500 nM) são injetadas em tampão fosfato salino (PBS) com Tween™ 20 a 0,05% (PBST) a 25°C a uma taxa de fluxo de aproximadamente

25 25 ul/min. As taxas de associação (k_{on}) e as taxas de dissociação (k_{off}) são calculadas usando-se um modelo de ligação Langmuir um-para-um simples (Programa de Avaliação BIAcore versão 3.2) pelo ajuste simultâneo da associação e dissociação do sensorgrama. A constante de equilíbrio de

dissociação (k_d) foi calculada como a razão k_{off}/k_{on} . Consulte, por exemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Se a on-rate exceder 106 M-1 S-1 pelo teste de ressonância plasmônica de superfície acima, então a on-rate pode ser determinada pelo uso de uma técnica de extinção de fluorescência que mede o aumento ou diminuição na intensidade de emissão fluorescente (excitação = 295 nm; emissão = 340 nm, 16 nm band-pass) a 25°C de 20nM de um anticorpo anti-VEGF (forma Fab) em PBS, pH 7,2, na presença de concentrações crescentes da forma reduzida do VEGF humano (8-109) ou VEGF de camundongo, conforme medidas em um espectrômetro, como um espectrômetro equipado com parada de fluxo (Aviv Instruments) ou um espectrômetro SLM-Aminco série 8000 (ThermoSpectronic) com um cadinho de mistura.

Um anticorpo “de bloqueio” ou um anticorpo “antagonista” é aquele que inibe ou reduz as atividades biológicas do antígeno ao qual se liga. Por exemplo, um anticorpo antagonista específico para VEGF se liga ao VEGF e inibe a capacidade do VEGF induzir a proliferação celular endotelial vascular. Em certas realizações, anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas inibem completamente a atividade biológica do antígeno.

A menos que indicado de outra forma, a expressão “anticorpo multivalente” é usada ao longo deste relatório descritivo para denominar um anticorpo que compreende três ou mais sítios de ligação de antígeno. O anticorpo multivalente é preferencialmente modificado geneticamente para conter três ou mais sítios de ligação de antígeno e, geralmente, não é um anticorpo IgM ou IgA de sequência nativa.

Um fragmento “Fv” é um fragmento de anticorpo que contém um reconhecimento de antígeno e sítio de ligação completos. Esta região consiste de um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve em estreita associação, que pode ser de natureza covalente,

por exemplo, em scFv . É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero V_H - V_L . Coletivamente, as seis CDRs ou um subconjunto destas conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. No entanto, até um único domínio variável (ou metade de uma Fv que compreende somente três CDRs específicas para um antígeno) possui a habilidade de reconhecer e se ligar a um antígeno, embora usualmente com afinidade mais baixa do que o sítio de ligação completo.

Como usado no presente pedido, "domínio variável do anticorpo" refere-se às porções das cadeias leve e pesada das moléculas de anticorpo que incluem sequências de aminoácidos de Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs, isto é, CDR1, CDR2 e CDR3) e Regiões de Estrutura (FRs). V_H refere-se ao domínio variável da cadeia pesada. V_L refere-se ao domínio variável da cadeia leve. De acordo com os métodos usados nesta invenção, as posições de aminoácidos determinadas para CDRs e FRs podem ser definidas de acordo com Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 e 1991)). A numeração de aminoácidos dos anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno está também de acordo com aquela de Kabat.

Como usado no presente pedido, o termo "Regiões Determinantes de Complementaridade" (CDRs, isto é, CDR1, CDR2 e CDR3) refere-se aos resíduos de aminoácidos de um domínio variável do anticorpo, cuja presença destes é necessária para ligação de antígeno. Cada domínio variável tipicamente tem três regiões CDR identificadas como CDR1, CDR2 e CDR3. Cada região determinante de complementaridade pode compreender resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" como definido por Kabat (isto é, aproximadamente resíduos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) e 89 a 97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31 a 35 (H1), 50 a 65 (H2)

e 95 a 102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de uma “alça hipervariável” (por exemplo, resíduos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) e 91 a 96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 26 a 32 (H1), 53-55 (H2) e 96 a 101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Em alguns casos, uma região determinante de complementaridade pode incluir aminoácidos tanto de uma região CDR definida de acordo com Kabat como uma região de alça hipervariável. Por exemplo, a CDRH1 da cadeia pesada do anticorpo 4D5 inclui aminoácidos 26 a 35.

“Região de estrutura” (a partir deste ponto “FR”) são aqueles resíduos do domínio variável, exceto os resíduos da CDR. Cada domínio variável tipicamente tem quatro FRs identificadas como FR1, FR2, FR3 e FR4. Se as CDRs estão definidas de acordo com Kabat, os resíduos da FR da cadeia leve estão posicionados aproximadamente nos resíduos 1 a 23 (LCFR1), 35 a 49 (LCFR2), 57 a 88 (LCFR3), e 98 a 107 (LCFR4) e os resíduos da FR da cadeia pesada estão posicionados aproximadamente nos resíduos 1 a 30 (HCFR1), 36 a 49 (HCFR2), 66 a 94 (HCFR3), e 103 a 113 (HCFR4) nos resíduos de cadeia pesada. Se as CDRs compreendem resíduos de aminoácidos de alças hipervariáveis, os resíduos da FR da cadeia leve estão posicionados aproximadamente nos resíduos 1 a 25 (LCFR1), 33 a 49 (LCFR2), 53 a 90 (LCFR3), e 97 a 107 (LCFR4) e os resíduos da FR da cadeia pesada estão posicionados aproximadamente nos resíduos 1 a 25 (HCFR1), 33 a 52 (HCFR2), 56 a 95 (HCFR3), e 102 a 113 (HCFR4) nos resíduos da cadeia pesada. Em alguns casos, quando a CDR compreende aminoácidos tanto de uma CDR como definido por Kabat e aqueles de uma alça hipervariável, os resíduos da FR serão ajustados como consequência. Por exemplo, quando CDRH1 inclui aminoácidos H26-H35, os resíduos da FR1 da cadeia pesada

estão nas posições 1-25 e os resíduos da FR2 estão nas posições 36-49.

O fragmento "Fab" contém um domínio variável e constante da cadeia leve e um domínio variável e primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ compreendem um par de
5 fragmentos Fab que estão geralmente ligados covalentemente próximos às suas terminações carboxila por dobradiças cisteína entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo são também conhecidos na técnica.

Fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia única" ou "scFv"
10 compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, sendo que estes domínios estão presentes em uma única cadeia polipeptídica. Geralmente, o polipeptídeo Fv também compreende um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L , que permite que scFv forme a estrutura desejada para a ligação de antígeno. Para uma revisão de sFv, consulte Pluckthun em *The Pharmacology of*
15 *Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds. Springer-Verlag, Nova York, páginas 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se aos fragmentos pequenos de anticorpo com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (V_H) conectado a um
20 domínio variável da cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica (V_H e V_L). Usando-se um ligante muito curto para o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a parear com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. Diacorpos são descritos de forma geral, por exemplo, na patente EP 404.097;
25 documento WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

A expressão "anticorpos lineares" geralmente refere-se aos anticorpos descritos em Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995).

Resumidamente, estes anticorpos compreendem um par de segmentos *tandem* Fd ($V_H C_H1 - V_H - C_H1$) que juntos com polipetídeos da cadeia leve complementar, formam um par de regiões de ligação de antígeno. Anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

- 5 O termo “anticorpo monoclonal”, como usado no presente pedido, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto pela possível ocorrência natural de mutações que podem estar presentes em menores quantidades.
- 10 Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigênico. Além disso, ao contrário de preparações de anticorpo convencional (policlonal) que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno.
- 15 O modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, e não sendo necessária a produção de anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método de hibridoma, primeiro
- 20 descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante (consulte, por exemplo, patente US 4.816.567). Os “anticorpos monoclonais” podem também ser isolados de bibliotecas de anticorpo em fago que utilizam as técnicas descritas em Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por
- 25 exemplo.

Os anticorpos monoclonais no presente especificamente incluem anticorpos “quiméricos” (imunoglobulinas), nos quais uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica a, ou homóloga às sequências correspondentes em

anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico a, ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (patente US 4.816.567; e Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

Formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (por exemplo, murino) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Em sua maioria, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), nos quais resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador), como camundongo, rato, coelho ou primata não humano tendo especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em algumas ocorrências, resíduos (FR) da região de estrutura Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar, ainda, o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) da imunoglobulina, tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, consulte Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986);

Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Um “anticorpo humano” é aquele que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde àquela de um anticorpo produzido por um humano e/ou que foi produzido usando-se qualquer uma das técnicas para se fazer anticorpos humanos, conforme divulgado no presente pedido. Esta definição de um anticorpo humano especificamente exclui um anticorpo humanizado que compreende resíduos de ligação de antígenos não humanos. Anticorpos humanos podem ser produzidos usando-se várias técnicas conhecidas. Em uma realização, o anticorpo humano é selecionado de uma biblioteca de fago, em que esta biblioteca de fago expressa anticorpos humanos (Vaughan *et al.* *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Anticorpos humanos também podem ser feitos pela introdução de *loci* de imunoglobulina humana em animais transgênicos, por exemplo, camundongos cujos genes endógenos de imunoglobulina foram parcialmente ou completamente inativados. Mediante desafio, observa-se produção de anticorpo humano, que intimamente lembra aquela vista em humanos sob todos os aspectos, incluindo rearranjo do gene, montagem e repertório de anticorpo. Esta abordagem está descrita, por exemplo, nas patentes US 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 e nas seguintes publicações científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 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). Alternativamente, o anticorpo humano pode ser preparado via imortalização de linfócitos B humanos que produzem um anticorpo dirigido contra um antígeno

alvo (tais linfócitos B podem ser recuperados de um indivíduo ou podem ser imunizados *in vitro*). Consulte, por exemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991) e patente US 5.750.373.

5 Um anticorpo de “afinidade madura” é aquele com uma ou mais alterações em uma ou mais CDRs deste, o que resulta em um aprimoramento na afinidade do anticorpo para o antígeno, em comparação a um anticorpo parental que não possui aquela(s) alteração(ões). Anticorpos de afinidade madura preferenciais terão afinidades nanomolar ou até afinidades picomolar para o antígeno alvo. Anticorpos de afinidade madura são produzidos por processos conhecidos na técnica. Marks *et al. Bio/Technology* 10:779-783 (1992) descreve maturação de afinidade por mistura de domínios de VH e VL. Mutagênese aleatória de CDR e/ou de resíduos de estrutura são descritas por: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Um “sítio de ligação de antígeno funcional” de um anticorpo é aquele capaz de se ligar a um antígeno alvo. A afinidade de ligação ao antígeno do sítio de ligação de antígeno não é necessariamente tão forte quanto aquela do anticorpo parental a partir do qual o sítio de ligação de antígeno é derivado, mas a capacidade para se ligar ao antígeno deve ser mensurável usando-se qualquer um dos diversos métodos conhecidos para avaliação da ligação do anticorpo a um antígeno. Além disso, a afinidade de ligação de antígeno, de cada um dos sítios de ligação de antígeno de um anticorpo multivalente no presente pedido, precisa ser quantitativamente a mesma. Para os anticorpos multiméricos no presente pedido, o número de sítios de ligação de antígeno funcionais pode ser estimado usando-se análise

por ultracentrifugação no Exemplo 2 da Publicação do Pedido de Patente 20050186208. De acordo com este método de análise, diferentes proporções de antígeno alvo para anticorpo multimérico são combinadas e a média do peso molecular dos complexos é calculada, assumindo-se diferentes números de sítios de ligação funcionais. Estes valores teóricos são comparados aos valores experimentais atuais, obtidos com o objetivo de avaliar o número de sítios de ligação funcionais.

Um anticorpo que tem uma “característica biológica” de um dado anticorpo é aquele que possui uma ou mais características biológicas daquele anticorpo, o que diferencia este anticorpo dos outros anticorpos que se ligam ao mesmo antígeno.

Com o objetivo de selecionar anticorpos que se ligam a um epitopo em um antígeno ligado por um anticorpo de interesse, pode ser realizado um teste rotineiro de interbloqueio, como aquele descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow e David Lane (1988).

Um “anticorpo dependente da espécie” é aquele que tem uma forte afinidade de ligação para um antígeno de uma primeira espécie de mamífero em comparação àquela que tem para um homólogo deste antígeno de uma segunda espécie de mamífero. Normalmente, o anticorpo dependente da espécie “se liga especificamente” a um antígeno humano (isto é, tem um valor de afinidade de ligação (K_d) de não mais do que cerca de 1×10^{-7} M, preferencialmente não mais do que cerca de 1×10^{-8} M e mais preferencialmente não mais do que cerca de 1×10^{-9} M), mas tem uma afinidade de ligação para um homólogo do antígeno de uma segunda espécie de mamífero não-humano que é menor do que pelo menos cerca de 50 vezes, ou pelo menos aproximadamente 500 vezes, ou pelo menos cerca de 1000 vezes, mais fraca do que sua afinidade de ligação para o antígeno humano. O

anticorpo dependente da espécie pode ser qualquer um dos diversos tipos de anticorpos, conforme definido acima. Em uma realização, um anticorpo dependente da espécie é um anticorpo humanizado ou humano.

Como usado no presente pedido, “anticorpo mutante” ou “anticorpo variante” refere-se a uma sequência variante de aminoácido do anticorpo dependente da espécie em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos do anticorpo dependente da espécie foram modificados. Tais mutantes necessariamente têm menos do que 100% de identidade de sequência ou similaridade com o anticorpo dependente da espécie. Em uma realização, o anticorpo mutante terá uma sequência de aminoácido que possui pelo menos 75% de identidade de sequência ou similaridade com a sequência de aminoácido tanto do domínio variável de cadeia pesada como leve do anticorpo dependente da espécie, com mais preferência pelo menos 85%, com mais preferência pelo menos 90% e com a máxima preferência pelo menos 95%. Identidade ou similaridade com relação a esta sequência é definida no presente pedido como a porcentagem de resíduos de aminoácido na sequência candidata que são idênticos (isto é, os mesmos resíduos) ou similares (isto é, resíduos de aminoácido do mesmo grupo baseado em propriedades comuns das cadeias laterais, ver abaixo) com os resíduos de anticorpo dependente da espécie, após alinhamento das sequências e introdução de *gaps*, se necessário, para alcançar a porcentagem máxima de identidade de sequência. Nenhum N-terminal, C-terminal, extensões internas, deleções ou inserções na sequência do anticorpo fora do domínio variável devem ser construídas para afetar a identidade ou similaridade de sequência.

Para aumentar a meia vida no soro do anticorpo ou polipeptídeo contendo as sequências de aminoácidos desta invenção, pode-se inserir um epitopo de ligação do receptor de resgate no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo), conforme descrito na patente US 5.739.277. Por

exemplo, uma molécula de ácido nucléico que codifica o epitopo de ligação do receptor de resgate pode ser ligada na estrutura a um ácido nucléico que codifica uma sequência polipeptídica desta invenção, de modo que a proteína de fusão expressa pela molécula de anticorpo elaborada geneticamente compreende o epitopo de ligação do receptor de resgate e uma sequência polipeptídica desta invenção. Como usado no presente, o termo “epitopo de ligação do receptor de resgate” refere-se a um epitopo da região Fc de uma molécula IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄) que é responsável por aumentar *in vivo* a meia vida de soro da molécula de IgG (por exemplo, Ghetie et al., *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), Tabela 1). Anticorpos com substituições em uma região Fc deste e meia vida no soro aumentada são também descritos nos documentos WO 00/42072, WO 02/060919; Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)). Em outra realização, a meia vida no soro também pode ser aumentada, por exemplo, inserindo-se outras sequências polipeptídicas. Por exemplo, anticorpos ou outros polipeptídeos úteis nos métodos da invenção podem ser inseridos na albumina do soro ou a uma porção da albumina do soro que se liga ao receptor FcRn ou uma albumina do soro que se liga ao peptídeo de modo que a albumina do soro se liga ao anticorpo ou ao polipeptídeo, por exemplo, tais sequências polipeptídicas são divulgadas no documento WO 01/45746. Em uma realização preferencial, o peptídeo da albumina do soro a ser inserido compreende uma sequência de aminoácido de DICTLRWGCLW. Em outra realização, a meia vida de um Fab é aumentada por estes métodos. Consulte também, Dennis *et al. J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) para albumina do soro que se ligam a sequências peptídicas.

Uma “proteína receptora quimérica do VEGF” é uma molécula receptora do VEGF que tem sequências de aminoácidos derivadas a partir de pelo menos duas proteínas diferentes, pelo menos uma das quais é uma

proteína receptora do VEGF. Em certas realizações, a proteína receptora quimérica do VEGF é capaz de se ligar e inibir a atividade biológica do VEGF.

Um polipeptídeo "isolado" ou anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que poderiam interferir no uso diagnóstico ou terapêutico para o polipeptídeo ou anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em uma realização, o anticorpo será purificado (1) para mais que 95%, em peso, de polipeptídeo ou anticorpo, conforme determinado pelo método Lowry, e mais preferencialmente mais que 99%, em peso, (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de N-terminal ou sequência de aminoácido interna usando-se um sequenciador de copo giratório, ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando-se *Coomassie blue* ou, preferencialmente, *silver stain*. O polipeptídeo ou anticorpo isolado inclui o polipeptídeo ou anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo não esteja presente. Geralmente, no entanto, o polipeptídeo ou anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

Por "fragmento" entende-se uma porção de um polipeptídeo ou molécula de ácido nucléico que contém pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou mais do comprimento total da molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo de referência. Um fragmento pode conter 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100, 200, 300, 400, 500, 600, ou mais nucleotídeos ou 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos ou mais.

"Tratamento" refere-se a ambos os tratamentos, terapêutico e profilático, ou medidas preventivas. Aqueles que necessitam de tratamento

incluem aqueles que já têm um tumor benigno, canceroso ou não-metastático, bem como aqueles cuja ocorrência ou recorrência de câncer será prevenida.

O termo "quantidade terapeuticamente efetiva" refere-se a uma quantidade de um agente terapêutico para tratar ou prevenir uma doença ou disfunção em um mamífero. No caso de câncer, a quantidade terapeuticamente efetiva do agente terapêutico pode reduzir o número de células cancerosas, reduzir o tamanho do tumor, inibir (isto é, diminuir até certo ponto e preferencialmente interromper) a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos, inibir (isto é, diminuir até certo ponto preferencialmente interromper) metástases do tumor, inibir, até certo ponto, o crescimento do tumor, e/ou aliviar até certo ponto um ou mais dos sintomas associados ao câncer. Até certo ponto, a droga pode prevenir o crescimento e/ou destruir células cancerosas existentes, podendo ser citostática e/ou citotóxica. Para terapia de câncer, a eficácia *in vivo* pode ser medida, por exemplo, pela avaliação da duração de sobrevida, do tempo de progressão da doença (TTP), taxas de resposta (RR), duração da resposta e/ou qualidade de vida.

Os termos "câncer" e "canceroso" referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Estão incluídos nesta definição os cânceres benignos e malignos. Por "câncer no estágio inicial" ou "tumor no estágio inicial" significa um câncer não invasivo ou metastático ou é classificado como um estágio 0, I ou II de câncer.

O termo "pré-canceroso" refere-se a uma condição ou a um crescimento que tipicamente precede ou evolui para um câncer. Um crescimento "pré-canceroso" terá células que são caracterizadas pela regulação, proliferação ou diferenciação anormal do ciclo celular, que pode ser determinada por marcadores de regulação do ciclo celular, proliferação celular ou diferenciação.

Por “displasia” entende-se qualquer crescimento anormal, desenvolvimento de tecido, órgão ou células. Preferencialmente, a displasia é de alto grau ou pré-cancerosa.

Por “metástase” entende-se a dispersão de câncer a partir de seu local inicial para outros locais no corpo. As células cancerosas podem desprender-se de um tumor primário, penetrar nos vasos linfáticos e sanguíneos, circular através do sistema sanguíneo e crescer em um foco distante (metástase) em tecidos normais em qualquer local do corpo. A metástase pode ser local ou distante. A metástase é um processo sequencial, dependente do desprendimento das células tumorais do tumor primário, que viajam através da corrente sanguínea e param em um local distante. Neste novo local, as células estabelecem um suprimento sanguíneo e podem crescer para formar uma massa ameaçadora da vida.

Tanto as vias estimuladoras como inibidoras na célula tumoral regulam este comportamento e as interações entre a célula tumoral e as células hospedeiras no local distante também são significantes.

Por “não-metastático” entende-se um câncer benigno ou que permanece no local inicial e que não penetrou no sistema linfático ou sanguíneo, ou nos tecidos além do local inicial. Geralmente, um câncer não-metastático é qualquer câncer que está no estágio 0, I ou II e ocasionalmente um câncer no estágio III.

Por “tumor primário” ou “câncer primário” entende-se o câncer original e não uma lesão metastática localizada em outro tecido, órgão ou local no corpo do sujeito.

Por “tumor benigno” ou “câncer benigno” entende-se um tumor que permanece localizado no local de origem e não tem a capacidade de se infiltrar, invadir ou realizar metástase em um local distante.

Por “massa tumoral” entende-se o número de células cancerosas,

o tamanho de um tumor ou a quantidade de câncer no sangue. Esta massa tumoral também é chamada de carga tumoral.

Por “número de tumor” entende-se o número de tumores.

Por “sujeito” entende-se um mamífero, incluindo, mas não se limitando a, um mamífero humano ou não-humano, como um bovino, equino, canino, ovino ou felino. Em uma realização, o sujeito é um humano.

O termo “terapia anticâncer” refere-se a uma terapia para o tratamento de câncer. Exemplos de agentes terapêuticos anticâncer incluem, mas não se limitam a, por exemplo, agentes quimioterapêuticos, agentes inibidores do crescimento, agentes citotóxicos, agentes usados na radioterapia, agentes antiangiogênese, agentes apoptóticos, agentes antitubulina e outros agentes para tratar o câncer, como anticorpos anti-HER-2, anticorpos anti-CD20, um antagonista do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, um inibidor tirosina quinase), inibidor HER1/EGFR (por exemplo, erlotinibe (TarcevaTM), inibidores do fator de crescimento derivado de plaquetas (por exemplo, GleevecTM (Imatinib Mesylate)), um inibidor COX-2 (por exemplo, celecoxibe), interferons, citocinas, antagonistas (por exemplo, que neutralizam anticorpos) que se ligam a um ou mais dos seguintes alvos, receptor(es) ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA ou VEGF, TRAIL/Apo2, e outros agentes químicos orgânicos e bioativos, etc. Combinações destes são também incluídas na invenção.

O termo “agente citotóxico” como usado no presente pedido refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa destruição de células. O termo tem a intenção de incluir isótopos radioativos (por exemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} , e Re^{186}), agentes quimioterapêuticos, e toxinas como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destes.

Um “agente quimioterapêutico” é um composto químico útil no

tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes como tiotepa e ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonados como busulfan, improsulfan e piposulfan; 5 aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo a análoga sintética topotecan), briostatina; calistatina; CC-1065 10 (incluindo suas análogas adozelesina, carzelesina e bizelesina sintética análogas); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo as sintéticas análogas, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio tais como clorambucila, clornafazina, clolofosfamida, 15 estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos como os antibióticos enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama1I e 20 caliqueamicina ômega I1 (consulte, por exemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; bifosfonatos, como clodronato, uma esperamicina; assim como cromóforos de neocarzinostatina e cromóforos de antibióticos enedina cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, 25 cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRAMYCIN® (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e deoxidoxorrubicina), epirubicina,

esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido
 micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina,
 puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina,
 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabólitos como
 5 metotrexato, e 5-fluorouracil (5-FU); análogos do ácido fólico como
 denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como
 fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina
 tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina,
 dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tais como
 10 calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano,
 testolactona; anti-adrenais tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano;
 ácido fólico restabelecedor tais como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de
 aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; ansacrina; bestrabucila;
 bisantrena; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina;
 15 acetato de eliptínio; um epotileno, etoglucideo; nitrato de gálio; hidroxíurea;
 lentinan; lonidainina; maitansinoides tais como maitansina e ansamitocinas;
 mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet;
 pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico, 2-etil hidrazida; procarbazona;
 complexos de polissacarídeos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR);
 20 razoxana; rizoxina; sizofirana; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona;
 2,2',2"-triclóro trietil amina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina
 A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina;
 mitobronitol; mitolactol; pipobromana; gacitosina; arabinosida ("Ara-C");
 ciclofosfamida, tiotepa; taxóides, por exemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-
 25 Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ livre de Cremofor,
 formulação de paclitaxel de nanopartículas de albumina elaborada
 geneticamente (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) e
 TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France ; cloranbucila;

GEMZAR® gencitabina, 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina NAVELBINE® vinorelbina; novantrona, teniposide, edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda, ibandronato; irinotecano (Camptosar, CPT-11) (incluindo o regime de tratamento de irinotecano com 5-FU e leucovorin), inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides como ácido retinóico; capecitabina; combretastatina; leucovorin (LV); oxaliplatina, incluindo o regime de tratamento de oxaliplatina (FOLFOX), inibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por exemplo, erlotinibe (TracevaTM)) e VEGF-A que reduz a proliferação celular e sais farmacêuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima.

Também incluído nesta definição estão os agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação de hormônios em tumores, como antiestrógeno e moduladores do receptor de estrógeno. (SERMs), incluindo, por exemplo, tamoxifeno (incluindo tamoxifeno NOLVADEX®). raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, quinoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno FARESTON®, inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrógeno nas glândulas adrenais, como, por exemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutemida, MEGASE® acetato de megestrol, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrazola, vorozola RIVISOR®, letrozola FEMARA®, e anastrozola ARIMIDEX® , e antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina, assim como, troxacitabina (um análogo de 1-3 dioxalano nucleosídeo citosina), oligonucleotídeos *antisense*, particularmente aqueles que inibem expressão gênica nas vias de sinalização envolvidas na proliferação celular anormal, tais como, por exemplo, PKC-alfa, Raf e H-Ras, ribozimas como inibidor de expressão de VEGF (por exemplo, ANGIOZYME®

ribozima) e inibidor de expressão de HER2; vacinas tais como vacina de terapia gênica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN® e vacina VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2, inibidor topoisomerase 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; vinorelabin e esperamicinas (consulte 5 patente US 4.675.187), e sais farmacêuticamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um dos acima.

“Proteínas quinases” referem-se a uma ampla classe de enzimas que catalisam a transferência de γ -fosfato do ATE para o grupo hidroxila na cadeia de Ser/Thr ou Tyr em proteínas e peptídeos e estão intimamente 10 envolvidas no controle de várias funções celulares importantes, particularmente o sinal de transdução, diferenciação e proliferação. Embora cada uma destas proteínas quinases fosforilem substratos específicos de proteínas/peptídeos, todas se ligam ao mesmo segundo substrato de ATP em uma bolsa altamente conservada. Várias doenças, de forma especial o câncer, estão ligadas à 15 perturbação da via de sinalização mediada por proteína quinase.

“Inibidores de proteína quinase” referem-se aos compostos de alto ou baixo peso molecular capazes de bloquear uma ou mais atividades de proteínas quinases. Em certas realizações, inibidores de proteínas quinases são inibidores tirosina quinase de baixo peso molecular (TKIs) que atingem um 20 ou mais receptores tirosina quinase envolvidos no crescimento tumoral, angiogênese patológica e progressão metastática do câncer. TKIs atingem o domínio quinase intracelular do receptor, com isso reduzindo ou interrompendo o sinal de transdução. Além de inibir VEGFR, muitas das pequenas moléculas TKIs desenvolvidas atingem outros receptores, especialmente aqueles na família 25 do domínio quinase *split* dos receptores tirosina quinase. Exemplos de receptores tirosina quinase incluem o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e receptor do fator de

crescimento de fibroblastos (FGFR). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é outro mediador importante na angiogênese relacionada ao tumor. Ele é secretado por muitos tumores de uma forma parácrina, e acredita-se que promova a proliferação celular endotelial e formação do estroma.

- 5 Semelhante ao VEGF, a produção de PDGF é suprarregulada mediante condições de baixas taxas de oxigênio, como aquelas encontradas em tecidos tumorais pouco vascularizados. PDGF promove o crescimento tumoral através de múltiplos processos, incluindo estimulação autócrina de células cancerosas e estimulação parácrina de células estromais. Heldin *et al.*, *Physiol Rev* 79:1283-1316 (1999); Sundberg *et al.*, *Am J Pathol* 151:479-492 (1997). Muitas moléculas pequenas terapêuticas TKIs são conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, vatalanibe (PTK787), erlotinibe (TARCEVA®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinibe (SUTENT®), semaxanibe (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinibe (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701, 10 PKC- 412, Lapatinibe (GSK572016), VELCADE®, AZD2171, sorafenibe (NEXAVAR®), XL880 e CHIR-265.

O termo “forma de sal farmaceuticamente aceitável” refere-se àquelas formas de sal que mantêm a efetividade e propriedade biológica do composto ativo como sunitinibe. Tais sais incluem: (1) sal de adição de ácido que é obtido pela reação da base livre do composto parental com ácidos inorgânicos como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido nítrico, ácido 5-fosfórico, ácido sulfúrico, ácido perclórico e similares, ou com ácidos orgânicos como ácido acético, ácido oxálico, ácido málico (D) ou (L), ácido maléico, ácido metanosulfônico, ácido etanosulfônico, ácido p-toluenosulfônico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico ou ácido malônico e 20 similares, preferencialmente ácido clorídrico ou ácido málico (L) como sal L-malato de sunitinibe; or (2) sais formados quando um próton ácido presente no composto parental é substituído por um íon metálico, por exemplo, um íon

metálico alcalino, um íon terroso alcalino ou coordena com uma base orgânica. Íons exemplares incluem alumínio, cálcio, lítio, magnésio, potássio, sódio e zinco em suas valências usuais. Bases orgânicas preferenciais incluem aminas terciárias protonadas e cátions de amônia quaternária, incluindo em parte, trimetilamina, dietilamina, N,N'-dibenziletilenodiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilenodiamina, meglumina (N-metilglucamina) e procaina.

O termo "pró-droga", como usado neste pedido, refere-se a uma forma precursora ou derivada de uma substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica às células tumorais, em comparação à droga parental, e é capaz de ser ativada enzimaticamente ou convertida na forma parental mais ativa. Consulte, por exemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, páginas 375-382, 615º Encontro Belfast (1986) e Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). As pró-drogas desta invenção incluem, mas não se limitam a, pró-drogas contendo fosfato, pró-drogas contendo tiofosfato, pró-drogas contendo sulfato, pró-drogas contendo peptídeo, pró-drogas modificadas com D-aminoácido, pró-drogas glicosiladas, pró-drogas contendo β -lactano, pró-drogas contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituídas ou pró-drogas contendo fenilacetamida opcionalmente substituídas, pró-drogas 5-fluorocitosina e outras 5-fluorouridina que podem ser convertidas em drogas citotóxicas livres mais ativas. Exemplos de drogas citotóxicas que podem ser derivadas para uma forma pró-droga para uso nesta invenção incluem, mas não se limitam àqueles agentes quimioterapêuticos descritos acima.

Por "terapia de radiação" entende-se o uso de raios gama ou beta direcionados para induzir dano suficiente a uma célula de forma a limitar a capacidade de funcionar normalmente, ou destruir todas as células juntas. Será apreciado que haverá muitas formas conhecidas na técnica para a

determinação da dosagem e duração do tratamento. Tratamentos típicos são fornecidos como uma única administração e dosagens típicas estão na faixa de 10 a 200 unidades (Grays) por dia.

Por “reduzir ou inibir” entende-se a capacidade de causar uma diminuição geral de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais. Reduzir ou inibir pode se referir aos sintomas da disfunção sendo tratada, a presença ou tamanho da metástase, o tamanho do tumor primário ou o tamanho ou número dos vasos sanguíneos em disfunções angiogênicas.

AGENTES TERAPÊUTICOS

A presente invenção apresenta o uso de antagonistas do VEGF e inibidores de proteína quinase em combinação de terapia para tratar tumor em um sujeito. Um antagonista do VEGF refere-se a uma molécula capaz de se ligar ao VEGF, reduzir os níveis de expressão do VEGF ou neutralizar, bloquear, inibir, anular, reduzir ou interferir nas atividades biológicas do VEGF, incluindo sua ligação a um ou mais receptores do VEGF, angiogênese mediada pelo VEGF e sobrevivência celular endotelial ou proliferação. Incluídos como antagonistas do VEGF úteis nos métodos da invenção estão os polipeptídeos que se ligam especificamente ao VEGF, anticorpos anti-VEGF e fragmentos de ligação de antígeno destes, moléculas receptoras e derivadas que se ligam especificamente ao VEGF, dessa forma sequestrando sua ligação a um ou mais receptores, proteínas de fusão (por exemplo, VEGF-Trap (Regeneron)) e VEGF121-gelonin (Peregrine). Os antagonistas do VEGF também incluem variantes antagonísticas dos polipeptídeos VEGF, aptâmeros de RNA e corpos peptídicos contra VEGF. Exemplos destes estão descritos abaixo.

Anticorpos anti-VEGF úteis nos métodos da invenção incluem qualquer anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno deste, que se liga ao VEGF com afinidade e especificidades suficientes e podem reduzir ou inibir a

atividade biológica do VEGF. Um anticorpo anti-VEGF usualmente não se ligará a outro VEGF homólogo, como VEGF-B ou VEGF-C, nem a outros fatores de crescimento, como PIGF, PDGF ou bFGF. Exemplos de tais anticorpos anti-VEGF incluem, mas não se limitam àqueles fornecidos nas

5 "Definições" no presente pedido.

Os dois receptores de VEGF melhor caracterizados são VEGFR1 (também conhecido como Flt-1) e VEGFR2 (também conhecido como KDR e FLK-1 para o homólogo murino). A especificidade de cada receptor para cada membro da família VEGF varia, mas VEGF-A se liga tanto ao Flt-1 como ao

10 KDR. O receptor Flt-1 inteiro inclui um domínio extracelular que tem sete domínios Ig, um domínio transmembrana e um domínio intracelular com atividade tirosina quinase. O domínio extracelular envolvido na ligação do VEGF e do domínio intracelular está envolvido no sinal de transdução.

As moléculas receptoras do VEGF ou fragmentos destas que se

15 ligam especificamente ao VEGF podem ser usadas nos métodos da invenção para se ligar e sequestrar a proteína VEGF, com isso evitando a sinalização. Em certas realizações, a molécula receptora do VEGF, ou fragmento de ligação de VEGF desta, está na forma solúvel, como sFlt-1. Uma forma solúvel do receptor exerce um efeito inibitório na atividade biológica da proteína VEGF

20 pela ligação ao VEGF, com isso prevenindo o mesmo de se ligar aos seus receptores naturais presentes na superfície das células alvo. As proteínas de fusão receptoras do VEGF também estão incluídas, exemplos destas são descritos abaixo.

Uma proteína receptora quimérica do VEGF é uma molécula

25 receptora do VEGF que tem sequências de aminoácidos derivadas a partir de pelo menos duas proteínas diferentes, pelo menos uma das quais é uma proteína receptora do VEGF (por exemplo, o receptor flt-1 ou KDR), que é capaz de se ligar e inibir a atividade biológica do VEGF. Em certas

realizações, as proteínas receptoras quiméricas do VEGF da presente invenção consistem em duas sequências de aminoácidos derivadas de apenas duas moléculas receptoras do VEGF diferentes; no entanto, as sequências de aminoácidos que compreendem um, dois, três, quatro, cinco, seis ou sete domínios similares ao Ig da região de ligação do ligante do receptor flt-1 e/ou KDR podem ser ligadas às sequências de aminoácidos de outras proteínas não relacionadas, por exemplo, sequências de imunoglobulinas. Outras sequências de aminoácidos às quais os domínios similares à Ig são combinados serão facilmente aparentes para os técnicos no assunto. Exemplos de proteínas receptoras quiméricas do VEGF incluem Flt-1/Fc, KDR/Fc ou FLt-1/KDR/Fc solúveis (também conhecidos como VEGF Trap). (Consulte, por exemplo, Publicação PCT documento WO 97/44453).

Uma proteína receptora do VEGF solúvel ou proteínas receptoras quiméricas do VEGF da presente invenção inclui proteínas receptoras do VEGF que não estão fixas à superfície das células através do domínio transmembrana. Como tal, formas solúveis do receptor do VEGF, incluindo proteínas receptoras quiméricas, quando capazes de se ligar e inativar o VEGF, não compreendem um domínio transmembrana e, dessa forma, não se associam à membrana celular das células nas quais a molécula é expressa.

Aptâmeros são moléculas de ácido nucléico que formam estruturas terciárias que são capazes de se ligar especificamente a uma molécula alvo, como um polipeptídeo VEGF. A geração e uso terapêutico de aptâmeros são bem conhecidos na técnica. Consulte, por exemplo, patente US 5.475.096. Um aptâmero do VEGF é um oligonucleotídeo peguillado modificado, que adota uma conformação tridimensional que permite que o mesmo se ligue ao domínio extracelular do VEGF. Um exemplo de um aptâmero terapeuticamente efetivo que atinge o VEGF, para tratamento de degeneração macular relacionada à idade é pegaptanibe (Macugen™, OSI).

Informações adicionais sobre aptâmeros podem ser encontradas na Publicação de Pedido de Patente US 20060148748.

Um corpo peptídico é uma sequência peptídica ligada a uma sequência de aminoácidos que codifica um fragmento ou uma porção de uma molécula de imunoglobulina. Polipeptídeos podem ser derivados de sequências aleatórias selecionadas por qualquer método para ligação específica, incluindo, mas não se limitando a tecnologia de exibição por fago. Em uma realização, o polipeptídeo selecionado pode ser ligado a uma sequência de aminoácido que codifica a porção Fc de uma imunoglobulina.

Corpos peptídicos que se ligam especificamente e antagonizam com o VEGF também são úteis nos métodos da invenção.

Os inibidores de proteína quinase úteis na presente invenção são aqueles que têm pelo menos a capacidade de bloquear a via de sinalização do PDGF, atingindo um PDGFR tirosina quinase. Em certas realizações, os inibidores são moléculas pequenas, compostos não-peptídicos. Em uma realização, os inibidores de proteína quinase da invenção atingem tanto PDGFR como VEGFR-2 tirosina quinases. Um exemplo do duplo inibidor PDGFR/VEGFR-2 é sunitinibe.

Sunitinibe (SUTENT®, SU11248, Pfizer Inc) é um inibidor oral que atinge diversas proteínas relacionadas aos receptores tirosina quinase incluindo PDGFR-beta, KIT e FLT-3, bem como os três receptores do VEGF. SUTENT® é o sal malato de sunitinibe. Malato de sunitinibe está descrito quimicamente como ácido butanodióico, hidróxi-(2S)-, combinado com N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-diidro-2-oxo-3H-indol-3-ilidina)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida (1:1). A fórmula molecular é $C_{22}H_{27}FN_4O_2 \cdot C_4H_6O_5$. Sun *et al.*, *J Med Chem* 41:2588-2603 (1998). Estudos pré-clínicos mostraram que sunitinibe tem efeitos antiangiogênicos mediados através de VEGFR e PDGFR-beta e dirigem a atividade antitumor através de KIT em

várias linhagens celulares tumorais. Abrams *et al.*, *Mol Cancer Ther* 2:1011-21 (2003); O'Farrell *et al.*, *Blood* 101:3597-605 (2003). Um recente estudo em tumores de carcinoma pulmonar de Lewis demonstraram que sunitinibe retarda a progressão do crescimento tumoral e atenua o desenvolvimento de metástases, embora não cause regressão de tumores primários. Osusky *et al.*, *Angiogenesis* 7:225-33 (2004). Com base em evidências pré-clínicas/clínicas, o mecanismo de atividade para sunitinibe em RCC é conhecido como sendo através da dupla inibição da via do VEGF em células endoteliais e PDGFR-beta expresso nos pericitos de suporte. Motzer *et al.*, *JAMA* 295:2516-24 (2006). Sunitinibe foi aprovado recentemente nos EUA para uso em carcinoma de células renais avançado e tumores estromais gastrointestinais (GIST).

COMBINAÇÃO DE TERAPIAS

A presente invenção apresenta o uso combinado de um antagonista do VEGF e um inibidor de proteína quinase como parte de um regime de tratamento específico, com a intenção de fornecer um efeito benéfico a partir da atividade combinada destes agentes terapêuticos. O efeito benéfico da combinação inclui, mas não se limita a, co-ação farmacocinética ou farmacodinâmica resultante da combinação dos agentes terapêuticos. A presente invenção é particularmente útil no tratamento de cânceres de vários tipos em vários estágios.

O termo câncer engloba um conjunto de disfunções proliferativas, incluindo, mas não se limitando a, crescimento pré-canceroso, tumores benignos e tumores malignos. Tumores benignos permanecem localizados no local de origem e não têm a capacidade de se infiltrar, invadir ou realizar metástase em locais distantes. Tumores malignos invadem e danificam outros tecidos ao redor dos mesmos. Eles também podem adquirir a capacidade de se desligar do local original e se espalhar para outras partes do corpo (metástase), usualmente através da corrente sanguínea ou através do sistema

linfático, onde os linfonodos estão localizados. Os tumores primários são classificados pelo tipo de tecido a partir dos quais eles surgem, tumores metastáticos são classificados pelo tipo de tecido a partir dos quais as células cancerosas são derivadas. Ao longo do tempo, as células de um tumor maligno tornam-se anormais e parecem cada vez menos com células normais. Esta alteração na aparência das células cancerosas é chamada de grau do tumor, e as células cancerosas são descritas como sendo bem diferenciadas (baixo grau), moderadamente diferenciadas, fracamente diferenciadas ou indiferenciadas (alto grau). As células bem diferenciadas são quase normais na aparência e lembram as células normais a partir das quais se originaram. As células indiferenciadas são células que se tornaram tão anormais que não é mais possível determinar a origem das células.

Os sistemas de estágio do câncer descrevem até onde o câncer se espalha automaticamente e tenta classificar os pacientes em prognósticos e tratamentos no mesmo grupo de estágio. Muitos testes podem ser realizados para ajudar a classificação no estágio do câncer, incluindo biopsia e certos testes de imagem como um raio-X de tórax, mapeamento de ossos, mapeamento CT e mapeamento MRI. Exames de sangue e uma avaliação clínica também são usados para avaliar a saúde geral do paciente e detectar se o câncer se espalhou para certos órgãos.

Para classificar o câncer em estágios, o *American Joint Committee on Cancer* classifica inicialmente o câncer, especialmente tumores sólidos, em uma categoria com letras, usando o sistema de classificação TNM. Os cânceres são designados com a letra T (tamanho do tumor), N (nódulos palpáveis), e/ou M (metástases). T1, T2, T3 e T4 descrevem o tamanho crescente da lesão primária N0, N1, N2, N3 indicam o avanço progressivo envolvendo nódulos; e M0 e M1 refletem a ausência ou presença de metástases distantes.

No segundo método de classificação por estágio, também conhecido como *Overall Stage Grouping* ou *Roman Numeral Staging*, os cânceres são divididos em estágios de 0 a IV, incorporando o tamanho das lesões primárias, bem como a presença de nódulos que se espalham e de metástases distantes. Neste sistema, os casos são agrupados em quatro estágios estipulados por números romanos de I até IV, ou são classificados como “recorrentes”. Para alguns cânceres, o estágio 0 é denominado “*in situ*” ou “Tis,” como carcinoma do duto *in situ* ou carcinoma lobular *in situ* para cânceres de mama. Adenomas de alto grau também podem ser classificados como estágio 0. Em geral, cânceres no estágio I são cânceres localizados e pequenos e que são usualmente curáveis, enquanto no estágio IV usualmente representam câncer inoperável ou metastático. Cânceres no estágio II e III são usualmente localizados e avançados e/ou exibem envolvimento de linfonodos locais. Em geral, números mais altos no estágio indicam a doença mais extensiva, incluindo maior tamanho do tumor e/ou dispersão do câncer para linfonodos próximos e/ou órgãos adjacentes ao tumor primário. Estes estágios são definidos precisamente, mas a definição é diferente para cada tipo de câncer e é conhecida pelos técnicos no assunto.

Muitos registros de câncer, como *NCI's Surveillance, Epidemiology e End Results Program* (SEER), usam um resumo de estágio. Este sistema é usado para todos os tipos de câncer. Este agrupa os casos de câncer em cinco categorias principais:

In situ é um câncer inicial que está presente apenas na camada de células na qual ele se inicia.

Localizado é um câncer limitado ao órgão no qual ele se inicia, sem evidência de dispersão.

Regional é um câncer que se espalha além do local original (primário) para os linfonodos ou órgãos e tecidos vizinhos.

Distante é um câncer que se espalha a partir do local primário para os órgãos linfonodos ou linfonodos vizinhos.

Desconhecido é usado para descrever casos para os quais não há informação suficiente para indicar um estágio.

5 Além disso, é comum o câncer retornar em meses ou anos após o tumor primário ter sido removido. O câncer que reaparece após o tumor visível ter sido erradicado é chamado de doença recorrente. A doença que reaparece na área do tumor primário é recorrente local e a doença que reaparece como metástase é denominada recorrente distante.

10 O tumor pode ser um tumor sólido ou um tumor não sólido ou de tecido macio. Exemplos de tumores de tecido macio incluem leucemia (por exemplo, leucemia mielogênica crônica, leucemia mielogênica aguda, leucemia linfoblástica aguda em adultos, leucemia mielogênica aguda, leucemia linfoblástica aguda de células B maduras, leucemia linfocítica crônica, leucemia polinfocítica, ou leucemias de células cabeludas) ou linfoma (por exemplo, linfoma não-Hodgkin, linfoma cutâneo de células T, ou doença de Hodgkin). Um tumor sólido inclui qualquer câncer nos tecidos do corpo exceto sangue, medula óssea ou sistema linfático. Os tumores sólidos podem ainda ser divididos naqueles de origem de células epiteliais e aqueles de origem de
15 células não epiteliais. Exemplos de tumores sólidos de células epiteliais incluem tumores do trato gastrointestinal, cólon, mama, próstata, pulmão, rim, fígado, pâncreas, ovário, cabeça e pescoço, cavidade oral, estômago, duodeno, intestino delgado, intestino grosso, ânus, vesícula biliar, lábio, nasofaringe, pele, útero, órgão genital masculino, órgãos urinários, bexiga e
20 pele. Os tumores sólidos de origem não epitelial incluem sarcomas, tumores no cérebro e tumores nos ossos.

AGENTES QUIMIOTERAPÊUTICOS

A combinação de terapia da invenção pode ainda compreender

um ou mais agentes quimioterapêuticos. A administração combinada inclui co-administração ou administração concorrente, usando-se formulações separadas ou uma formulação farmacêutica única, e administração consecutiva em qualquer ordem, sendo que preferencialmente exista um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos simultaneamente exerçam suas atividades biológicas.

Um agente quimioterapêutico, se administrado, é usualmente administrado em dosagens conhecidas para isso, ou opcionalmente reduzidas devido à ação combinada das drogas ou efeitos colaterais negativos atribuíveis à administração do agente quimioterapêutico antimetabólito. A preparação e a programação de dosagens para tais agentes quimioterapêuticos podem ser usadas de acordo com instruções do fabricante ou conforme determinado empiricamente por um médico. Em uma realização onde o agente quimioterapêutico é paclitaxel, este é administrado toda semana (por exemplo, cerca de 60 a 90 mg/m²) ou a cada 3 semanas (por exemplo, cerca de 135 a 200 mg/m²). Dosagens adequadas de docetaxel incluem 60 mg/m², 70 mg/m², 75 mg/m², 100 mg/m² (a cada 3 semanas); ou 35 mg/m², 40 mg/m² (toda semana).

Vários agentes quimioterapêuticos que podem ser combinados estão divulgados acima. Em certas realizações, os agentes quimioterapêuticos a serem combinados são selecionados a partir do grupo que consiste em um taxóide (incluindo docetaxel e paclitaxel), vinca (como vinorelbina ou vinblastina), composto de platina (como carboplatina ou cisplatina), inibidor da aromatase (como letrozol, anastrozol ou exemestano), antiestrógeno (por exemplo, fulvestrant ou tamoxifeno), etoposido, tiotepa, ciclofosfamida, metotrexato, doxorrubicina lipossômica, doxorrubicina lipossômica peguilada, capecitabina, gencitabina, inibidor de COX-2 (por exemplo, celecoxibe), ou inibidor de proteossoma (por exemplo, PS342). Em uma realização, a

combinação de terapia da invenção é combinada com paclitaxel. Em outra realização, a combinação de terapia da invenção é combinada com carboplatina e paclitaxel.

FORMULAÇÃO, DOSAGENS E ADMINISTRAÇÃO

5 Os agentes quimioterapêuticos usados na invenção serão formulados, dosados e administrados em um modo consistente com as boas práticas médicas. Os fatores para consideração neste contexto incluem a disfunção específica sendo tratada, o sujeito específico sendo tratado, a condição clínica individual do paciente, a causa da disfunção, o local de
10 administração do agente, o método de administração, a programação de administração, a interação droga-droga dos agentes a serem combinados e outros fatores conhecidos pelos médicos.

Formulações terapêuticas são preparadas usando-se métodos padrão conhecidos na técnica, pela mistura do ingrediente ativo que tem o grau
15 desejado de purificação com veículos opcionais, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis (*Remington's Pharmaceutical Sciences* (20^a edição), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Carreadores aceitáveis incluem tampões salinos ou tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico;
20 polipeptídeo de baixo peso molecular (menor que cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes como
25 EDTA; álcoois de açúcar como manitol ou sorbitol; contra-íons formadores de sal como sódio; e/ou tensoativos não iônicos como TWEEN™, PLURONICS™ ou PEG.

Opcionalmente, em uma realização, a formulação contém um sal

farmaceuticamente aceitável, como cloreto de sódio em concentrações próximas da fisiológica. Opcionalmente, em outra realização, as formulações da invenção podem conter um conservante farmaceuticamente aceitável. Em certas realizações a concentração de conservante está na faixa de 0,1 a 2,0%,
5 tipicamente v/v. Conservantes adequados incluem aqueles conhecidos na técnica farmacêutica. Álcool benzílico, fenol, m-cresol, metilparabeno e propilparabeno são conservantes preferenciais. Opcionalmente, em ainda outra realização, as formulações da invenção podem incluir um tensoativo farmaceuticamente aceitável em uma concentração de 0,005 a 0,02%.

10 A formulação no presente pedido também pode conter mais de um componente ativo, conforme necessário para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não afetem contrariamente um ao outro. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação e nas quantidades efetivas para o propósito
15 pretendido.

Os ingredientes ativos também podem ser inseridos em microcápsula preparada, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em
20 sistemas coloidais de distribuição de droga (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas estão divulgadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, acima.

Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas.
25 Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contêm o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos modelados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada

incluem poliéster, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) ou poli(vinilálcool)), polilactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, como LUPRON
5 DEPOTTM (microesferas injetáveis compostas de copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolido) e ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Enquanto polímeros como acetato de etileno-vinil e ácido láctico-ácido glicólico permitem liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Anticorpos quando
10 encapsuladas permanecem no corpo por um longo tempo, eles podem denaturar ou agregar como um resultado de exposição à umidade a 37°C, que resulta em uma perda de atividade biológica e possíveis mudanças na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser desenvolvidas para a estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o
15 mecanismo de agregação revela formação de ligação S-S intermolecular através de intercâmbio tio-bissulfeto, a estabilização pode ser alcançada pela modificação de resíduos sulfidril, liofilização de soluções ácidas, controle da umidade do conteúdo, uso apropriado dos aditivos e desenvolvimento de composições de matriz polimérica específica.

20 Os agentes terapêuticos da invenção são administrados a um paciente humano de acordo com métodos conhecidos, como administração intravenosa, por exemplo, como um bolus ou por infusão contínua por um período de tempo, por rotas intramuscular, intraperitoneal, intracérebro-espinhal, subcutânea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, ou
25 inalação. No caso de antagonistas do VEGF, o local de administração é particularmente desejado se os efeitos colaterais extensivos ou toxicidade estão associados com o antagonismo do VEGF. Uma estratégia *ex vivo* também pode ser usada para aplicações terapêuticas. Estratégias *ex vivo*

envolvem transfecção ou transdução das células obtidas a partir do sujeito com um polinucleotídeo que codifica um antagonista do VEGF. As células transfectadas ou transduzidas são então devolvidas ao sujeito. As células podem ser de qualquer tipo incluindo, sem limitação, células hematopoiéticas (por exemplo, células da medula óssea, macrófagos, monócitos, células dendríticas, células T ou células B), fibroblastos, células epiteliais, queratinócitos ou células musculares.

Por exemplo, se o antagonista do VEGF é um anticorpo, o anticorpo é administrado por qualquer meio adequado, incluindo parenteral, subcutâneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, e se desejado, por tratamento local imunossupressor e administração intralesional. Infusões parenterais incluem administração intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal ou subcutânea. Além disso, o anticorpo é administrado por infusão em pulsos, particularmente com doses decrescentes do anticorpo. Em uma realização, a dosagem é fornecida por injeção. Em outra realização, a dosagem é fornecida por injeções intravenosas ou subcutâneas, dependendo em parte se a administração é breve ou contínua.

Em outro exemplo, o composto antagonista do VEGF é administrado localmente, por exemplo, por injeções diretas, quando a disfunção ou localização do tumor permitir e as injeções podem ser repetidas periodicamente. O antagonista do VEGF também pode ser entregue ao sujeito sistemicamente ou diretamente para as células tumorais, por exemplo, para um tumor ou para uma formação de tumor seguida de excisão cirúrgica, a fim de prevenir ou reduzir a recorrência local ou metástases.

A administração dos agentes terapêuticos em combinação é tipicamente realizada por um período de tempo definido (usualmente minutos, horas, dias ou semanas, dependendo da combinação selecionada). A combinação de terapia destina-se a englobar a administração destes agentes

terapêuticos de um modo sequencial, ou seja, em que cada agente terapêutico é administrado em diferentes momentos, bem como a administração destes agentes terapêuticos, ou pelo menos dois agentes terapêuticos de uma maneira substancialmente simultânea.

5 O agente terapêutico pode ser administrado pela mesma rota ou por rotas diferentes. Por exemplo, o antagonista do VEGF na combinação pode ser administrado por injeção intravenosa, enquanto o inibidor de proteína quinase na combinação pode ser administrado oralmente. Alternativamente, por exemplo, ambos os agentes terapêuticos podem ser administrados
10 oralmente, ou ambos os agentes terapêuticos podem ser administrados por injeção intravenosa, dependendo dos agentes terapêuticos específicos. A sequência na qual os agentes terapêuticos são administrados também varia dependendo dos agentes específicos.

Dependendo do tipo e severidade da doença, cerca de 1 µg/kg a
15 100 mg/kg (por exemplo, 0,1 a 20 mg/kg) de cada agente terapêutico é uma dosagem candidata inicial para administração ao paciente, se, por exemplo, para uma ou mais administrações separadas ou por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar de aproximadamente 1µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionado acima. Para administrações
20 repetidas por vários dias ou por mais tempo, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que o câncer seja tratado, conforme medido pelos métodos descritos acima. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. Em um exemplo, se o antagonista do VEGF é um anticorpo, o anticorpo da invenção é administrado a cada duas a três semanas, em uma variação de
25 dosagem de cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg. Se o inibidor de proteína quinase é um composto molecular pequeno oral, a droga é administrada diariamente em uma variação de cerca de 25 mg/dia a cerca de 50 mg/dia. Além disso, o composto oral da invenção pode ser administrado tanto em um

regime tradicional intermitente de altas doses, como pelo uso de doses mais baixas e mais frequentes sem intervalos programados (denominada “terapia metronômica”). Quando é usado um regime intermitente, por exemplo, a droga pode ser fornecida diariamente por três semanas, seguido por uma semana de intervalo; ou diariamente por quatro semanas, seguido por um intervalo de duas semanas, dependendo da dose diária e indicação específica. O progresso desta terapia da invenção é facilmente monitorado por técnicas e testes convencionais.

Os exemplos a seguir têm a intenção de meramente ilustrar a prática da presente invenção e não são fornecidos com o objetivo de limitação. As divulgações de toda a patente e as literaturas científicas citadas no presente pedido são expressamente incorporadas em sua totalidade como referência.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

COMBINAÇÃO DE ANTI-VEGF E SUNITINIBE PARA A INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE TUMOR HUMANO *IN VIVO*

Esse experimento avalia o anticorpo monoclonal anti-VEGF B20-4.1 como monoterapia e em combinação com a molécula pequena do inibidor de tirosina quinase sunitinibe para a atividade contra vários xenoinxertos de carcinoma humano em camundongos nus.

MÉTODOS E MATERIAIS

As seguintes células tumorais humanas foram usadas no estudo de xenoinxerto:

Carcinoma de cólon humano LS174T

Carcinoma pulmonar humano de células não-pequenas H1299

Carcinoma humano de células renais 786-O

Carcinoma humano de células renais Caki-2

Carcinoma pancreático humano Bx-PC3

Foram usados camundongos nus atímicos fêmeas (10 a 11 semanas de idade no Dia 1 do estudo) ou camundongos C.B-17 SCID (15 a 16 semanas de idade no Dia 1 do estudo). Os xenoenxertos foram iniciados a partir de células cultivadas de carcinoma humano (no caso das células H1299) ou de tumores humanos existentes mantidos em camundongos submetidos à xenoenxertos. Cada camundongo do teste recebeu células tumorais ou fragmento tumoral implantado por via subcutânea no flanco direito e o crescimento de tumores foi monitorado. Após um período de crescimento tumoral, o comprimento destes dependia dos tumores humanos específicos testados, os camundongos foram colocados em grupos diferentes, sendo cada um composto por dez camundongos. O volume foi calculado usando-se a fórmula:

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = (W^2 \times l)/2$$

na qual w = largura e l = comprimento em mm de um tumor humano. O peso tumoral pode ser estimado com a suposição de que 1 mg é equivalente a 1 mm³ do volume tumoral.

Um anticorpo IgG controle e o MAb B20-4.1 de teste, bem como o sunitinibe foram usados no estudo. O controle e os anticorpos B20-4.1 foram administrados em um nível de dose única (5 mg/kg i.p., a cada duas semanas até o fim). O sunitinibe foi administrado em dois níveis de doses (25 ou 50 mg/kg p.o., uma vez ao dia até o fim).

Para os tratamentos de combinação dados a um grupo no mesmo dia, as doses de anticorpo foram administradas trinta minutos antes das doses de sunitinibe. Cada dose de PBS, IgG controle ou B20-4.1 foi administrada em um volume de 0,2 ml por 20 g de peso corporal (10 ml/kg) e cada dose de sunitinibe ou veículo foi administrada em um volume de 0,1ml por 20 g de peso corporal (5 ml/kg). Todas as doses foram escalonadas para os pesos corporais dos animais.

Os tumores foram medidos duas vezes por semana usando-se compasso de calibre. Cada animal foi sacrificado quando seu tumor alcançou o tamanho final de 2000 mm³ ou no encerramento do estudo, o que ocorresse primeiro. O resultado do tratamento foi baseado na inibição do crescimento tumoral (TGI). O TGI avalia os dados de todos os animais em um grupo, excluindo os animais que morreram devido a causas relacionadas ao tratamento (TR) ou não relacionadas ao tratamento (NTR), e é definido como a diferença entre os volumes tumorais médios dos grupos de tratamento e controle, expressos como uma porcentagem do volume tumoral médio do grupo controle. Um agente que produz pelo menos 60% do TGI neste teste é classificado como terapeuticamente ativo.

O tratamento pode causar a regressão parcial (PR) ou regressão completa (CR) do tumor em um animal. Em uma resposta PR, o volume tumoral é de 50% ou menor que o seu volume do Dia 1 durante três dias consecutivos de medidas durante o curso do estudo, e igual ou maior que 13,5 mm³ para um ou mais destas três medidas. Em uma resposta CR, o volume tumoral é menor que 13,5 mm³ durante três dias consecutivos de medidas durante o curso do estudo. Os animais foram monitorados pelas respostas de regressão.

Os animais foram sacrificados quando seus tumores alcançaram um volume de 2000 mm³ ou no término do estudo. As amostras séricas, tumorais e renais foram coletadas para testes adicionais incluindo avaliações histológicas do tumor e vascularidade tumoral.

Os animais foram pesados diariamente durante os cinco dias do estudo e, então, duas vezes por semana. Os camundongos foram observados frequentemente por sinais visíveis de quaisquer eventos adversos, efeitos colaterais relacionados ao tratamento e os sinais clínicos de toxicidade foram registrados quando observados. A toxicidade aceitável é definida como uma

perda média de peso corporal do grupo de menos de 20% durante o estudo e não mais que um óbito relacionado ao tratamento (TR) entre os dez animais tratados. Qualquer regime de dose que resulte em maior toxicidade é considerado acima da dose máxima tolerada (MID). Um óbito é classificado como TR se atribuível aos efeitos colaterais do tratamento, conforme evidenciado por sinais clínicos e/ou necropsia ou se devido a causas desconhecidas durante o período de dosagem ou dentro de 10 dias da última dose. Um óbito é classificado como um NTR se não houver evidências de que o óbito estava relacionado aos efeitos colaterais do tratamento.

A análise estatística das diferenças entre as médias dos tumores implantados nos grupos controle e tratado foram analisadas usando-se o teste *U* de Mann-Whitney. A análise estatística bicaudada foi conduzida no nível de significância de $P=0,05$. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos em $0,01 \leq P \leq 0,05$ e altamente significativo em $P < 0,01$.

RESULTADOS

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DO CARCINOMA DE CÍLON LS174T

A Figura 1A mostra o crescimento tumoral em volume em relação ao tempo para cada grupo de camundongos no estudo sobre o carcinoma de cólon LS174T. O grupo 2 (curva com losangos) foi administrado com o anticorpo controle; O grupo 4 (curva com quadrado) foi administrado com 4 doses de B20-4.1 sozinho; O grupo 7 (curva plana) foi administrada com sunitinibe a 50 mg/kg p.o. diariamente durante 14 dias; e o grupo 11 (curva com triângulo) foi administrado com B20-4.1 e sunitinibe no mesmo esquema de dose que os dos grupos em monoterapia. A Figura 1B é um plot de Kaplan-Meier dos mesmos resultados do estudo. Como mostrado em ambas as figuras, a combinação de B20-4.1 e sunitinibe produziu a inibição significativamente aumentada do crescimento do tumor de cólon em comparação ao tratamento com agente único.

Em um estudo separado de 25 dias, uma dose alta de sunitinibe (50 mg/kg diariamente) e uma dose baixa de sunitinibe (25 mg/kg diariamente) foram usados nos grupos em monoterapia e em combinação. Os MTVs e TGIs dos diferentes grupos de tratamento foram medidos no Dia 18. O B20-4.1 em monoterapia produziu um TGI marginal de 48%. O sunitinibe em monoterapia produziu respostas dependentes da dose, sem TGI na dose baixa e TGI não significativo de 43% na dose alta. A combinação de B20-4.1 com baixa dose de sunitinibe produziu um TGI de 50% que foi comparável ao B20-4.1 em monoterapia. A combinação de B20-4.1 com a dose mais alta de sunitinibe resultou em um TGI de 75%. Todos os tratamentos pareceram ser bem tolerados, sem evidências de toxicidade com base nas medidas de peso corporal ou sintomas clínicos.

INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DO NSCLC H1299

Dois estudos foram conduzidos para os xenoenxertos de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (NSCLC) H1299. As Figuras 2A e 2B representam os resultados de um estudo de tratamento em curto prazo que é semelhante ao estudo LS174T, conforme descrito acima. O grupo 2 (curva com losangos) foi administrado com o anticorpo controle; O grupo 4 (curva com quadrado) foi administrado com 4 doses de B20-4.1 sozinho; O grupo 7 (curva plana) foi administrado com sunitinibe a 50 mg/kg p.o. diariamente durante 14 dias; e o grupo 11 (curva com triângulo) foi administrado com B20-4.1 e sunitinibe no mesmo esquema de dose que os dos grupos em monoterapia. A Figura 2B é um plot de Kaplan-Meier dos mesmos resultados do estudo. Conforme mostrado em ambas as figuras, a combinação de B20-4.1 e sunitinibe produziu a inibição significativamente aumentada do crescimento do tumor de NSCLC em comparação ao tratamento com agente único.

A Figura 3 representa os resultados de um estudo de tratamento

em longo prazo dos tumores NSCLC H1299. O estudo também comparou os efeitos entre duas doses de sunitinibe – uma dose baixa em 25 mg/kg diariamente e uma dose alta em 50 mg/kg diariamente. O TGI foi calculado usando os dados de medida do Dia 19, quando todos os camundongos ainda permaneciam no estudo. B20-4.1 em monoterapia produziu um TGI de 64%, o que corresponde à atividade terapêutica sem respostas de regressão. O tratamento com 25 ou 50 mg/kg de sunitinibe produziu TGIs dependentes da dose de 32 e 62%. O grupo de tratamento com sunitinibe a 50 mg/kg não apresentou regressão parcial. O tratamento com a combinação de B20-4.1 e 25 ou 50 mg/kg de sunitinibe produziu TGIs de 74 e 82%, respectivamente com duas regressões parciais em cada grupo. Assim, o tratamento de combinação, tanto na baixa dose de sunitinibe como na alta dose de sunitinibe forneceu aumento significativo da atividade de inibição em relação aos tratamentos correspondentes de agentes únicos com B20-4.1 e sunitinibe. É especialmente significativo que em dose baixa, o sunitinibe como um agente único falhou em exercer atividade terapêutica neste estudo, enquanto a combinação B20-4.1/sunitinibe na mesma dose de sunitinibe forneceu uma inibição significativa para o crescimento tumoral do NSCLC. Todos os tratamentos pareceram ser bem tolerados, sem evidências de toxicidade com base nas medidas de peso corporal ou nos sintomas clínicos.

Além disso, para as medidas de TGI, as amostras tumorais foram utilizadas em testes histológicos para comparar as alterações morfológicas dos tumores sob monoterapias vs. combinação. A necrose tumoral e a densidade vascular foram medidas no fim do estudo. Conforme mostrado nas Figuras 8A-8C, a combinação de B20-4.1/sunitinibe resulta em forte aumento na necrose tumoral e diminuição da densidade microvascular.

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

Duas linhagens de xenoenxertos foram usadas no estudo de

crescimento tumoral para o carcinoma humano de células renais. A Figura 4 mostra o resultado de um estudo usando xenoenxertos de carcinoma de células renais 786-O. Enquanto as doses baixas e altas de sunitinibe foram utilizadas no estudo, apenas a dose alta de sunitinibe (50 mg/kg, diariamente) é mostrada na figura para o grupo de agente único e de combinação com B20-4.1. Neste estudo, B20-4.1 em monoterapia resultou em TGI a 67%, o sunitinibe em monoterapia resultou em um TGI de 80% e a combinação mostrou um TGI de 92%. A atividade da combinação de terapia foi significativamente melhor que o sunitinibe ou B20-4.1 como agente único ($p=0,0002$, $p<0,0001$, respectivamente). A combinação também apresentou eficácia superior (TGI =77%) quando uma dose mais baixa de sunitinibe (25 mg/kg qd) foi combinada com a terapia anti-VEGF ($p=0,0029$).

A Figura 6 mostra o resultado de um estudo usando-se xenoenxertos de carcinoma de células renais Caki-2 em camundongos SCID. As doses alta e baixa de sunitinibe são mostradas. O TGI foi calculado no Dia 29, que foi o último dia do estudo. Notavelmente, a monoterapia com B20-4.1 e a monoterapia de sunitinibe em baixa dose (25 mg/kg) resultaram em um volume médio tumoral (MTVs) no Dia 29 de 446 e 352 mm³, que não se traduziu para o TGI terapêutico sob a definição do estudo. Em comparação, os tratamentos de combinação do B20-4.1/sunitinibe produziram um TGI terapêutico de 65%, que é um restabelecimento significativo e significativo sobre que o agente administrado em monoterapia ($P < 0,001$). A monoterapia de sunitinibe em alta dose (50 mg/kg) produziu um TGI de 62%, enquanto o tratamento em combinação com o B20-4.1/sunitinibe na mesma dose produziu no TGI aumentado de 73%. Nenhuma resposta de regressão foi documentada em nenhum grupo. A combinação de B20-4.1 com 50 mg/kg de 0-025694 foi significativamente melhor que o B20-4.1 em monoterapia, mas não que o sunitinibe em monoterapia a 50 mg/kg. Entretanto, as curvas da

média e da mediana do crescimento tumoral sugerem uma tendência em direção à atividade de combinação. Todos os tratamentos pareceram ser bem tolerados, sem evidências de toxicidade com base nas medidas de peso corporal ou nos sintomas clínicos.

5 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DO CARCINOMA PANCREÁTICO

Um estudo do crescimento tumoral nos xenoenxertos de carcinoma pancreático humano Bx-PC3 foi desenvolvido usando-se agentes e métodos semelhantes aos utilizados em outros estudos descritos acima. As Figuras 5A e 5B mostram o resultado. Semelhante ao estudo em xenoenxertos de carcinoma de células renais Caki-2, a combinação de B20-4.1 e sunitinibe parece produzir um restabelecimento mais significativo que os agentes únicos quando baixas doses de sunitinibe foram administradas. Compare o grupo 5 ao Grupo 3 ou Grupo 2. Enquanto não se deseja se ligar à teoria, os resultados deste estudo e do estudo Caki-2 podem sugerir que enquanto 10 ambas as doses de sunitinibe exibem forte bloqueio de atividade do PDGFR, elas só exibem efeito de bloqueio da atividade do VEGFR na dose alta, para que a combinação com B20-4.1 em baixa dose fornecesse uma inibição mais significativa que o agente único. Tais achados fornecem uma justificativa forte para a combinação do agente anti-VEGF e o sunitinibe no tratamento de 15 tumores que respondem de maneira fraca à dose clínica da monoterapia, ou quando uma dose mais baixa de sunitinibe é mais desejável. 20

As Figuras 7A e 7B ilustram a combinação dos efeitos quando a dose baixa de sunitinibe (25mg/kg diariamente) foi usada nos modelos RCC Caki-2 (Figura 7A) e no NSCLC H1299 (Figura 7B).

25 Tomados juntos, esses estudos de camundongo com xenoenxerto fornecem fortes evidências para a combinação de terapias nas quais as vias do VEGF e PDGF são efetivamente marcadas, o que resulta além ou até mesmo atividade antitumoral sinérgica e, portanto, resultado clínico significativamente

aumentado.

EXEMPLO 2

COMBINAÇÃO DE ANTI-VEGF E SUNITINIBE PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER DE

MAMA

5 O câncer de mama contabiliza quase um terço de todos os novos diagnósticos de câncer entre mulheres nos Estados Unidos, com mais de 214.000 casos diagnosticados em 2006. Estima-se que mais de 41.000 mulheres morrerão por ano de sua doença. Jernal *et al.*, *CA Cancer J. Clin* 56:106-30 (2006). Apesar de muitos avanços no tratamento coadjuvante para
10 as doenças em estágio precoce, até 30 a 40% das mulheres desenvolverão recidiva sistêmica. Uma pequena parcela das mulheres com câncer de mama metastático (MTC) estará viva em 5 anos, enquanto apenas de 2 a 3% se tornarão sobreviventes em longo prazo. Greenburg *et al.*, *J. Clin. Oncol.*14:2197-205 (1996).

15 Este exemplo fornece um método de tratar o câncer de mama com a combinação de anti-VEGF, quimioterapia e sunitinibe, o qual pode resultar em sobrevida prolongada e restabelecimento da qualidade de vida, pela administração a um sujeito de uma dose eficaz de bevacizumab, sunitinibe e paclitaxel. Por exemplo, em certas realizações, um sujeito é administrado:
20 (1) bevacizumab a 10 mg/kg (por exemplo, com base no peso do sujeito no Dia 1) por infusão IV no dia 1 e dia 15 de um ciclo de 28 dias, (2) paclitaxel em uma dose de 65 mg/m² a 90 mg/m² (normalmente, 90 mg/m²) pela fusão IV a cada semana durante 3 semanas seguidas por uma semana por uma semana de repouso, e (3) sunitinibe, normalmente administrado por via oral, em uma dose
25 de 20 a 50 mg/dia, por exemplo, 25 mg/dia ou 37,5 mg/dia, diariamente durante 3 semanas seguidas pelo período de uma semana de repouso. Em certas realizações, um ciclo de tratamento é definido como 4 semanas. De maneira alternativa, o sunitinibe pode ser administrado ao sujeito em uma dose de 50

mg administrado de acordo com o esquema de 4 semanas recebendo o medicamento e 2 semanas de descanso. Farve *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 24(1):25-35 (2006). Normalmente, o bevacizumab é fornecido em frasco de vidro de 400 mg, o qual contém 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml) com um veículo que
 5 consiste em fosfato de sódio, trealose, polissorbato 20 e água esterilizada injetável. O paclitaxel está disponível como uma solução concentrada de 6 mg/ml em óleo de rícino polioxetilado (Cremaphor EL) a 50% e álcool desidratado a 50% em frascos de 5; 16,7 e 50 ml. Sutent® é o sal de malato do sunitinibe. O malato de sunitinibe é descrito quimicamente como ácido
 10 butanedióico, hidróxi-(2S)-, composto com N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-diidro-2-oxo-3H-indol-3-ilidina)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida (1:1). A fórmula molecular é $C_{22}H_{27}FN_4O_2 \cdot C_4H_6O_5$. As cápsulas de sunitinibe contêm malato de sunitinibe equivalente a 12,5 mg ou a 25 mg de sunitinibe com manitol, croscarmelose de sódio, povidona (K-25) e estearato de
 15 magnésio como ingredientes inativos.

Uma medida de resultado é a progressão da sobrevida livre (PFS) com base na análise (por exemplo, realização de uma avaliação da Unidade de Análise Independente (IRF)) da resposta tumoral, a qual pode ser avaliada pelos Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST) e/ou
 20 IRF (radiografias). Therasse *et al.*, *J. Natl Cancer Inst.* 92:205-16 (2000). A sobrevida global, sobrevida de 12 meses, resposta objetiva, duração da resposta objetiva e PFS de 12 meses também podem ser utilizados como uma medida de resultado. Os níveis plasmáticos das proteínas solúveis também podem ser avaliados, por exemplo, sVEGFR2, sVEGFR3 e VEGF-C e a via
 25 PDGF.

Os sujeitos para os métodos de tratamento são sujeitos que apresentam adenocarcinoma de mama (por exemplo, determinado por estudos histológicos ou citológicos). Normalmente, os sujeitos apresentam doença

metastática ou de recidiva localmente mensurável ou não mensurável. Em certas realizações, a doença de recidiva localmente não deve ser amenizada por cirurgia com intenção de curar. Em certas realizações, os sujeitos podem ter recebido terapia hormonal anterior, por exemplo, em ambientação adjuvante ou metastática (por exemplo, se descontinuou ≥ 2 semanas antes do Dia 1). Em certas realizações, o sujeito pode ter recebido quimioterapia adjuvante com não-taxano (por exemplo, se descontinuou ≥ 6 meses antes do início do programa). Em certas realizações, o sujeito pode ter recebido quimioterapia adjuvante com taxano (por exemplo, se descontinuou ≥ 12 meses antes do Dia 1). Opcionalmente, os sujeitos também podem ter recebido terapia simultânea com bifosfonato (por exemplo, se iniciada antes ou dentro dos primeiros 30 dias da inclusão no estudo). Opcionalmente, o sujeito também pode ter recebido radioterapia anterior quando iniciou o tratamento, com a condição de que o sujeito tenha se restabelecido de qualquer toxicidade aguda significativa (Grau ≥ 3) antes do Dia 1.

Em certas realizações, os sujeitos excluídos são os que apresentam status de HER2 desconhecido ou HER2 positivo conhecido. Em geral, o status de HER2 positivo pode ser identificado por um teste de fluorescência de hibridização *in situ* (FISH) ou pelo resultado 3+ imunohistoquímica por um método conhecido na técnica. Outros sujeitos excluídos são sujeitos com quimioterapia anterior para doença metastática ou localmente recidiva, os sujeitos com terapia hormonal anterior dentro de 2 semanas antes do Dia 1, sujeitos com quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante com taxano dentro de 12 meses antes do Dia 1, sujeitos com quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante dentro de 6 meses antes do Dia 1 ou sujeitos que tenham recebido quimioterapia não-taxano dentro de 6 meses antes do Dia 1 ou sujeitos que tenham recebido radioterapia recentemente, toxicidade aguda de Grau ≥ 3 em andamento. Os sujeitos excluídos também

são os com função de órgão inadequada (por exemplo, evidenciada por contagem de neutrófilos reduzida, uma contagem de plaquetas reduzida ou bilirrubina total maior que 1,5 mg/dl), com doença psiquiátrica ou médica séria não controlada, com hipertensão controlada inadequadamente (por exemplo, 5 definida como pressão sangüínea sistólica maior que 150 mmHg e/ou pressão sangüínea diastólica maior que 100 mmHg com medicações anti-hipertensivas), com histórico anterior de crise hipertensiva ou encefalopatia hipertensiva, com um histórico de angina instável ou infarto dentro de 12 meses antes do Dia 1, com um histórico de acidente vascular cerebral ou ataque 10 isquêmico temporário dentro de 12 meses antes do Dia 1, com evidencia de diátese hemorrágica ou coagulopatia significativa ou úlcera ativa, ferimento não cicatrizante sério, ou fratura óssea não tratada. Consulte também as exclusões adicionais nos rótulos do bevacizumabe e sunitinibe.

EXEMPLO 3

15 COMBINAÇÃO DE ANTI-VEGF E SUNITINIBE PARA O TRATAMENTO DE CâNCER PULMONAR AVANÇADO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS

O câncer de pulmão é causa principal de óbito por câncer nos Estados Unidos, com uma incidência de 174.470 novos casos e de 162.460 óbitos estimados para ocorrer em 2006. Aproximadamente de 55% a 75% dos 20 pacientes com câncer pulmonar de células não-pequenas (NSCLC) apresentam doença avançada (doença não cirúrgica ou metastática). A taxa de sobrevida global de 5 anos para pacientes com câncer de pulmão nos Estados Unidos é de 14%, apresentando apenas leve aumento nos últimos 20 anos. DeVita *et al.*, Cancer: principles and practice of oncology, 6th ed. 25 Filadélfia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2001. Os pacientes que apresentam a doença em Estágio IIIb e Estágio IV apresentam taxas de sobrevida de 5 anos de 6% e 8%, respectivamente. Mountain, *Chest* 111:1710-7 (1997). Após o tratamento inicial definitivo, que consiste de nova

cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou associações destas modalidades, aproximadamente 50% dos pacientes com doença em estágio precoce e de 80% daqueles com doença localmente avançada apresentarão recidiva ou o tratamento de primeira linha ou de última linha.

5 Este exemplo fornece um método de tratar o câncer pulmonar de células não- pequenas com a combinação de anti-VEGF, quimioterapia e sunitinibe, o qual pode resultar em sobrevida prolongada e restabelecimento da qualidade de vida, pela administração a um sujeito de uma dose eficaz de bevacizumab, sunitinibe e paclitaxel e carboplatina. Por exemplo, em certas

10 realizações, um sujeito é administrado: (1) bevacizumab em 15 mg/kg (por exemplo, com base no peso dos sujeitos no Dia 1) por infusão IV no dia 1 de um ciclo de 21 dias, (2) carboplatina como dosado pela área sob a curva (AUC = 6) com base na fórmula de Calvert (discutida com detalhes abaixo), (3) paclitaxel em uma dose de 200 mg/m² (por exemplo, com base no peso do

15 sujeito no Dia 1) pela infusão IV no dia 1 de cada ciclo de 21 dias por um total de quatro ciclos, e (4) sunitinibe, normalmente administrado por via oral, em uma dose de 20 a 50 mg/dia, por exemplo, 25 mg/dia ou 37,5 mg/dia, diariamente durante 2 semanas seguidas pelo período de repouso de uma semana. Em certas realizações, um ciclo de tratamento é definido como 3

20 semanas. De maneira alternativa, o sunitinibe pode ser administrado ao sujeito em uma dose de 50 mg administrado de acordo com o esquema de 4 semanas recebendo o medicamento e 2 semanas de descanso.

Conforme discutido acima, a carboplatina é dosada pela área sob a curva (AUC = 6) com base na fórmula de Calvert:

$$\text{Dose total (mg)} = (\text{AUC alvo}) \times (\text{GFR} + 25),$$

25 na qual GFR é a taxa de filtração glomerular em mililitros por minuto (ml/min) e a área sob a curva alvo (AUC) é 6 mg/ml x min. A CFR como eliminação da creatinina pode ser medida (de preferência) via coleta de urina

24 horas ou pode ser calculada com base na creatinina sérica usando a fórmula de Cockcroft-Gault (Cockcroft e Gault 1976). Para homens, a GFR é estimada como a seguir:

$$\text{GFR} = (140 - \text{idade}) \times \text{peso} / [72 \times (\text{creatinina sérica})].$$

Para mulheres, a GRF = 0,85 vezes esta fórmula. A idade em anos, peso em quilogramas, e a creatinina sérica em miligramas por decilitro.

Normalmente, o bevacizumabe é distribuído em frasco de vidro de 400 mg, que contém 16 ml de bevacizumabe (25 mg/ml) com um veículo que consiste em fosfato de sódio, trealose, polissorbato 20 e água esterilizada para injeção.

A carboplatina está disponível como uma solução aquosa esterilizada pré-misturada de 10 mg/ml pronta para diluição e administração parenteral. Os frascos estão disponíveis nos tamanhos de 50, 150, 450 e 600 mg.

O paclitaxel está disponível como uma solução concentrada de 6 mg/ml em óleo de rícino polioxietilado (Cremaphor EL) a 50% e álcool desidratado a 50% em frascos de 5; 16,7 e 50 ml.

O malato de sunitinibe é descrito quimicamente como ácido butanedióico, hidróxi-(2S)-, composto com *N*-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-diidro-2-oxo-3*H*-indol-3-ilidina)metil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxamida (1:1). A fórmula molecular é $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{FN}_4\text{O}_2 \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$. As cápsulas de sunitinibe contêm malato de sunitinibe equivalente a 12,5 mg ou a 25 mg de sunitinibe com manitol, croscarmelose de sódio, povidona (K-25) e estearato de magnésio como ingredientes inativos.

Uma medida de resultado é a progressão da sobrevida livre (PFS) com base na análise (por exemplo, realização de uma avaliação da Unidade de Análise Independente (IRF)) da resposta tumoral, a qual pode ser avaliada pelos Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST) e/ou

IRF (radiografias). A sobrevida global, resposta objetiva, duração da resposta objetiva também podem ser utilizadas como uma medida de resultado. Durante o curso do tratamento, as amostras de plasma podem ser retiradas dos pacientes podem ser retiradas dos pacientes para medidas de níveis plasmáticos e biomarcadores para previsão, como moléculas envolvidas na via de angiogênese, incluindo, mas não se limitando a VEGF, VEGFRs solúveis, PDGF e PDGFRs solúveis.

Os sujeitos para os métodos de tratamento são pacientes que apresentam NSCLC escamoso localmente avançado, de recidiva ou metastático (por exemplo, determinados por estudos histológicos ou citológicos). Em uma realização, os sujeitos excluídos são os pacientes com quimioterapia sistêmica anterior para doença metastática. Outros sujeitos são aqueles com malignidade ativa exceto câncer de pulmão, pacientes com participação atual, recente (dentro de 4 meses do Dia 1) ou que planejem participar de outro estudo que envolva medicamento experimental, e pacientes com tratamento anterior com agente anti-VEGF ou via semelhantes que as dos agentes alvo como o sunitinibe. Outros critérios de exclusão também podem ser utilizados, incluindo exclusões médicas em geral ou outras terapias típicas para bevacizumabe e sunitinibe.

EXEMPLO 4

COMBINAÇÃO DE ANTI-VEGF E SUNITINIBE PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER DE CÉLULA RENAL

O câncer de célula renal (RCC) constitui aproximadamente 2% de todas as malignidades, com uma incidência estimada de 39.000 casos por ano e aproximadamente 13.000 óbitos por ano nos Estados Unidos. Até recentemente, a eficácia dos tratamentos para doença metastática era muito ruim. Tais tratamentos incluíam citocinas (interferon α [IFN α] e interleucina-2 [IL-2], as quais forneceram pequeno benefício e um alto grau de toxicidade.

Este último foi o único agente aprovado para esta doença até o fim de 2005. Novos tratamentos têm surgido para pacientes com RCC metastático com dois agentes aprovados recentemente, sunitinibe (Sutent®) e sorafenib (Nexaver®).

Este exemplo fornece um método de tratar o câncer de célula renal com a combinação de anti-VEGF e sunitinibe, o qual pode resultar em sobrevida prolongada e restabelecimento da qualidade de vida, pela administração a um sujeito de uma dose eficaz de bevacizumabe e sunitinibe.

Por exemplo, em certas realizações, um sujeito é administrado: (1) bevacizumabe em 10 mg/kg (por exemplo, com base no peso do sujeito no Dia 1) pela infusão a cada 2 semanas no dia 1, 15 e 29 a cada ciclo de 42 dias (6 semanas) com (2) sunitinibe, normalmente administrado por via oral, em uma dose de 50 mg/dia durante 4 semanas seguidas por um período de repouso de 2 semanas. Em certas realizações, o ciclo de tratamento é definido como 4 semanas de sunitinibe e 2 semanas de repouso (6 semanas).

Normalmente, o bevacizumabe é distribuído em frasco de vidro de 400 mg, que contém 16 ml de bevacizumabe (25 mg/ml) com um veículo que consiste em fosfato de sódio, trealose, polissorbato 20 e água esterilizada para injeção.

O malato de sunitinibe é descrito quimicamente como ácido butanediólico, hidróxi-(2S)-, composto com *N*-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-diidro-2-oxo-3*H*-indol-3-ilidina)metil]-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxamida (1:1). A fórmula molecular é $C_{22}H_{27}FN_4O_2 \cdot C_4H_6O_5$. As cápsulas de sunitinibe contêm malato de sunitinibe equivalente a 12,5 mg ou a 25 mg de sunitinibe com manitol, croscarmelose de sódio, povidona (K-25) e estearato de magnésio como ingredientes inativos.

Uma medida de resultado é a progressão da sobrevida livre (PFS) com base na análise (por exemplo, realização de uma avaliação da Unidade de Análise Independente (IRF)) da resposta tumoral, a qual pode ser avaliada

pelos Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (RECIST) (Therasse *et al.*, New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors, *J. Natl Cancer Inst.* 2000;92:205-16, e/ou IRF (radiografias). A sobrevida global, resposta objetiva e a duração da resposta objetiva também
5 podem ser utilizadas como uma medida de resultado. Durante o curso do tratamento, as amostras plasmáticas podem ser retiradas dos pacientes podem ser retiradas dos pacientes para medidas de níveis plasmáticos e biomarcadores para previsão, como moléculas envolvidas na via de angiogênese, incluindo, mas não se limitando a VEGF, VEGFRs solúveis,
10 PDGF e PDGFRs solúveis.

Em uma realização, os sujeitos para os métodos de tratamento são pacientes que tiveram RCC metastático confirmado histologicamente que é predominantemente de célula clara (>50%). Em outra realização, os sujeitos incluídos são pacientes com doenças que podem ser medidas (lesões que
15 podem ser medidas com precisão em, pelo menos, uma dimensão (o maior diâmetro deve ser registrado) como 20 mm com técnicas convencionais ou como 10 mm com imagem de CT espiral) como definido pelo RECIST. Ainda, em outra realização, os sujeitos são aqueles com nefrectomia anterior.

Em uma realização, os sujeitos excluídos são pacientes com RCC
20 com características sarcomatóides predominantes. Outros sujeitos excluídos são aqueles com terapia sistemática ou adjuvante anterior para RCC. Ainda, em outra realização, os sujeitos excluídos são pacientes submetidos a radioterapia para RCC dentro de 2 dias antes do Dia 1, com exceção de radioterapia de fração única realizada para a indicação de controle da dor.
25 Ainda em outra realização, os sujeitos excluídos podem ser aqueles com necessidade atual de diálise e aqueles que já estão com o tratamento em andamento com bevacizumab, sunitinibe, sorafenibe, axitinibe, talidomida ou outros agentes, sob investigação ou no mercado, que ajam através da inibição

do VEGF ou por mecanismos antiangionênicos. Outros critérios de exclusão também podem ser utilizados, incluindo exclusões médicas em geral ou outras terapias típicas para bevacizumabe e sunitinibe.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA TRATAMENTO DE TUMOR, em um sujeito que compreende administrar ao dito sujeito um antagonista do VEGF e um inibidor de proteína quinase,

5 em que o dito antagonista do VEGF interfere na ligação do VEGF a um receptor celular,

em que o dito inibidor de proteína quinase é capaz de inibir pelo menos o receptor de proteína quinase do PDGF, e

em que a dita administração é por um período e em quantidade
10 suficiente para tratar ou prevenir o dito tumor no dito sujeito.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito antagonista do VEGF é um aptâmero capaz de se ligar especificamente ao VEGF.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito
15 antagonista do VEGF é uma proteína receptora do VEGF solúvel, ou um fragmento de ligação desta, ou uma proteína receptora quimérica do VEGF.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 3, em que a dita proteína quimérica receptora do VEGF compreende pelo menos o domínio 2 extracelular do Flt-1 ou KDR.

20 5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito antagonista do VEGF é um anticorpo anti-VEGF.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 5, em que o dito anticorpo é um anticorpo monoclonal.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 6, em que o dito
25 anticorpo é um anticorpo quimérico, totalmente humano ou humanizado.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, em que o dito anticorpo anti-VEGF é bevacizumabe, anticorpo da série G6, anticorpo da série B20 ou fragmentos deste de ligação ao VEGF.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, em que o anticorpo anti-VEGF é bevacizumabe.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o dito inibidor de proteína quinase é capaz de inibir tanto o receptor de proteína quinase do PDGF como o receptor de proteína quinase do VEGF.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, em que o dito inibidor de proteína quinase é sunitinibe ou um sal deste farmacologicamente aceitável.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o tumor é selecionado a partir do grupo que consiste em câncer de mama, câncer colorretal, câncer retal, câncer de pulmão de células não-pequenas, linfoma não-Hodgkin (NHL), câncer de célula renal, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer pancreático, sarcoma de tecidos moles, sarcoma de kaposi, carcinoma carcinóide, câncer de cabeça e pescoço, melanoma, câncer ovariano, mesotelioma e mieloma múltiplo

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, em que o tumor é câncer de pulmão de células não-pequenas.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, em que o câncer é metastático.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 12, em que o paciente não é previamente tratado.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, em que o antagonista do VEGF é bevacizumabe e o inibidor de proteína quinase é sunitinibe.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, em que o bevacizumabe é administrado ao sujeito intravenosamente a 10 mg/kg em semanas alternadas ou 15 mg/kg a cada três semanas, e em que sunitinibe é administrado oralmente ao sujeito em uma dose diária de cerca de 25 mg por

2, 3 ou 4 semanas seguidas por 1 a 2 semanas de pausa.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17, em que o bevacizumabe é administrado ao sujeito intravenosamente a 15 mg/kg a cada três semanas, e em que sunitinibe é administrado oralmente ao sujeito em uma
5 dose diária de cerca de 25 mg por 2 semanas seguidas por 1 semana de pausa.

19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 16, em que compreende, ainda, a administração de um ou mais agentes quimioterapêuticos ao sujeito.

10 20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, em que o agente quimioterapêutico é paclitaxel.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, em que os agentes quimioterapêuticos administrados são carboplatina e paclitaxel.

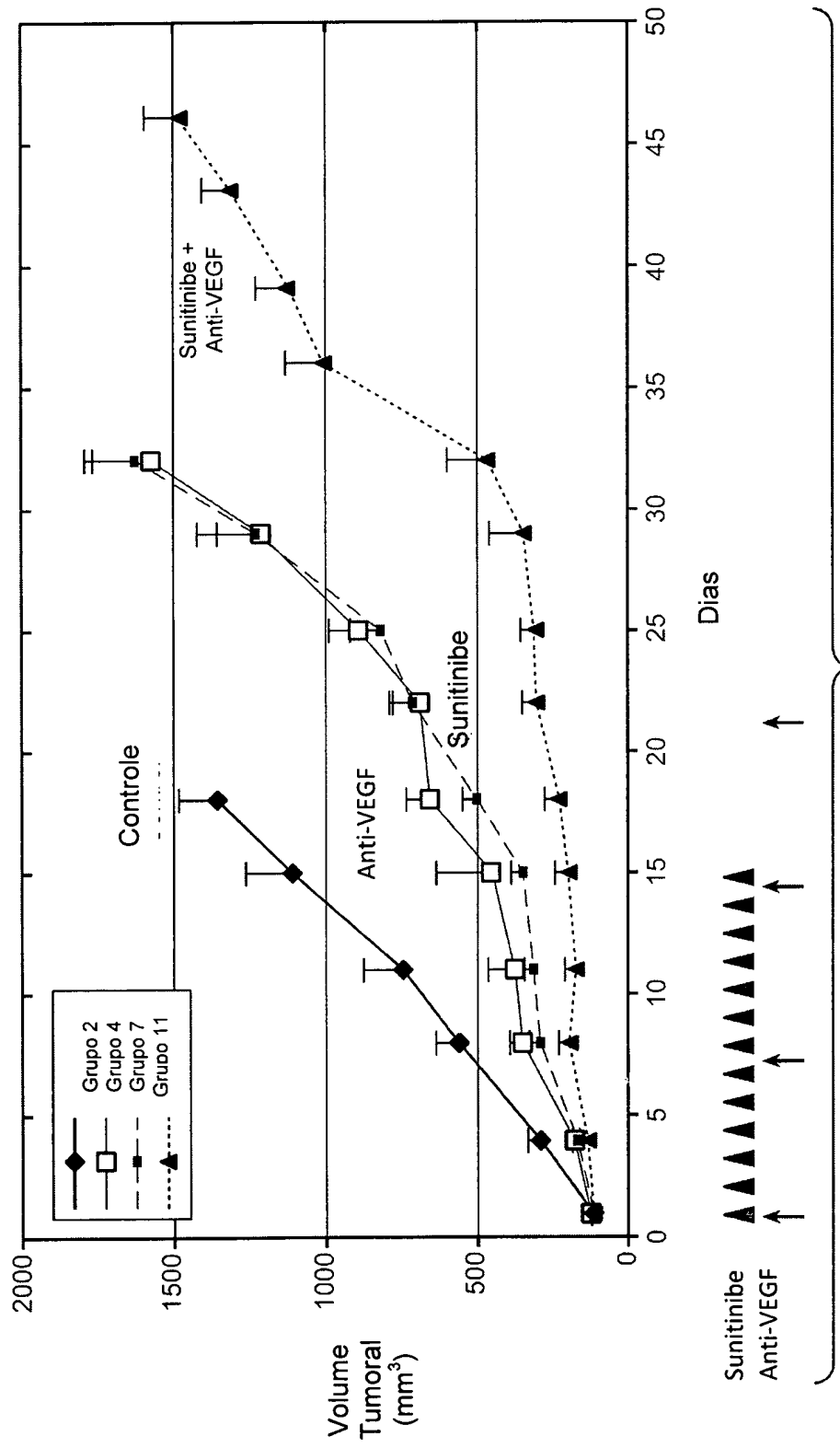
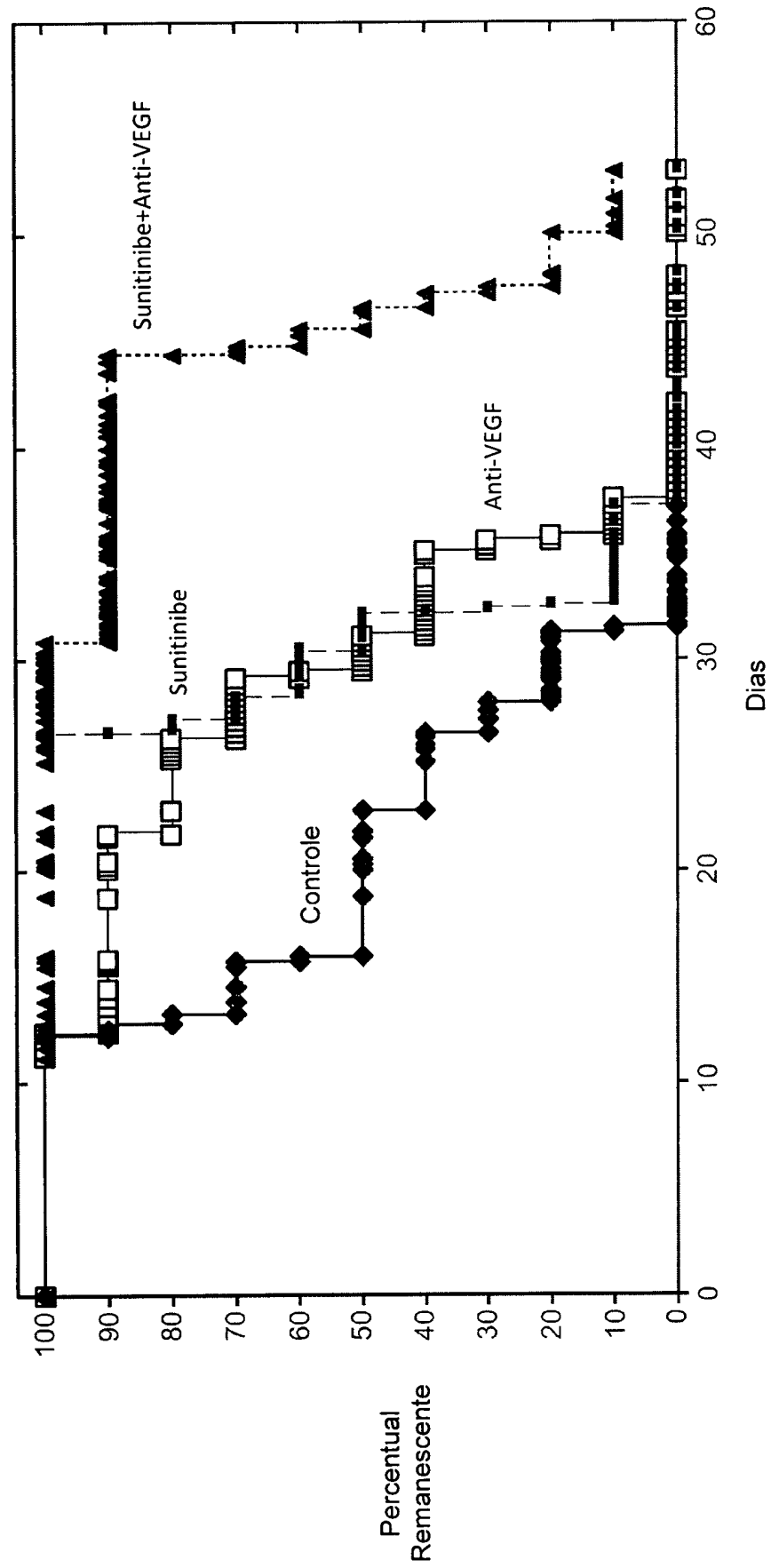


Fig.1A

**Fig.1B**

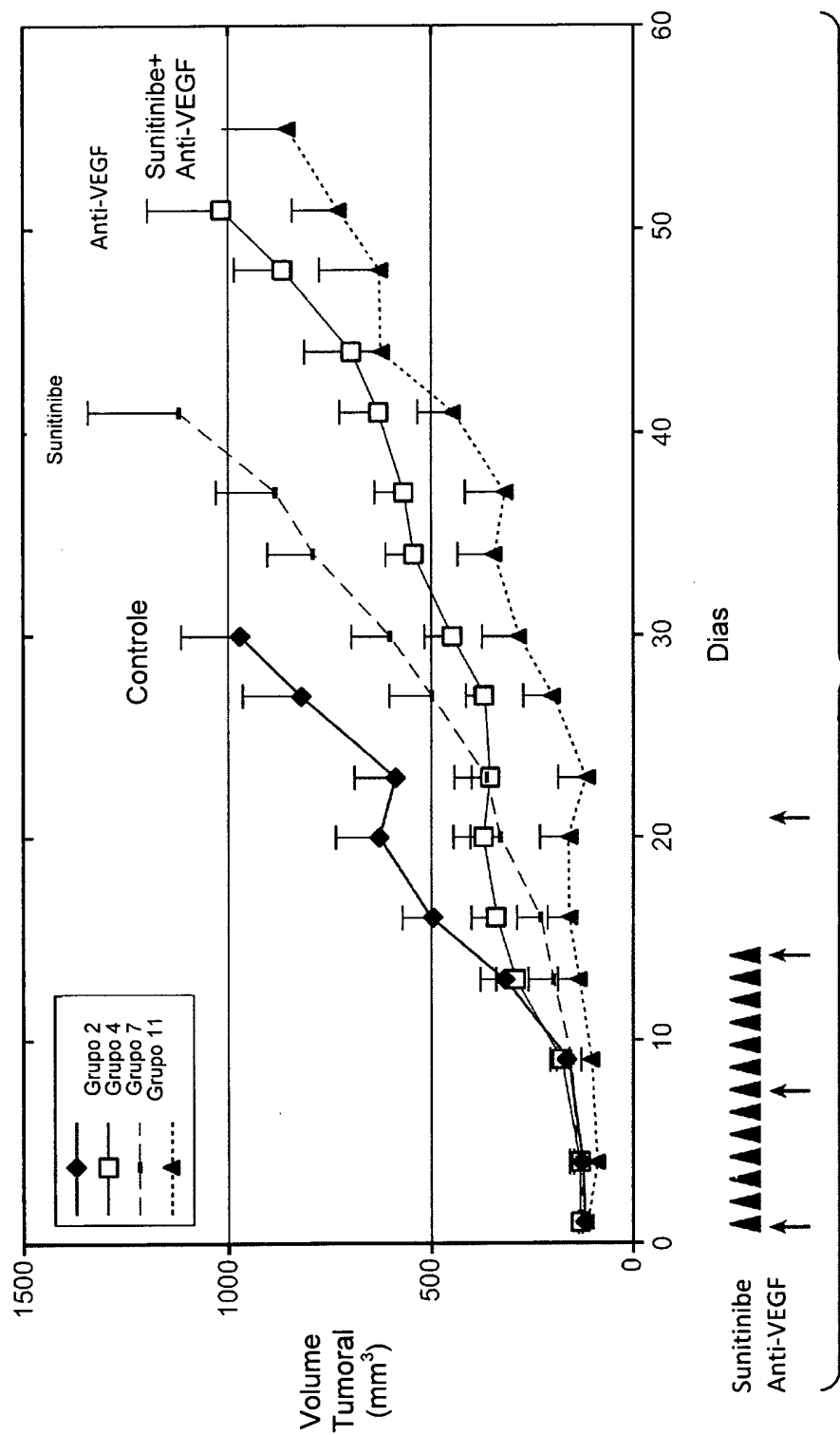
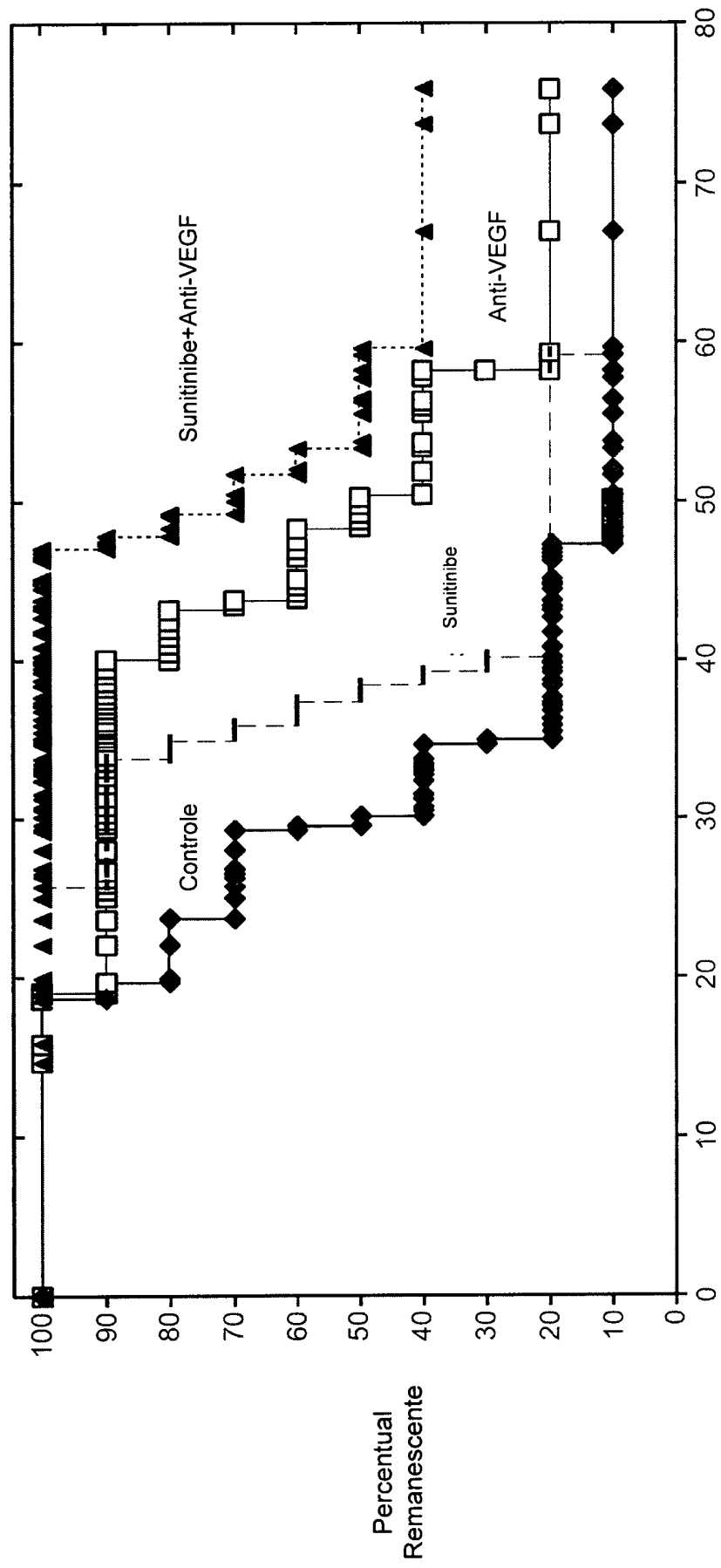


Fig.2A



Dias
Fig.2B

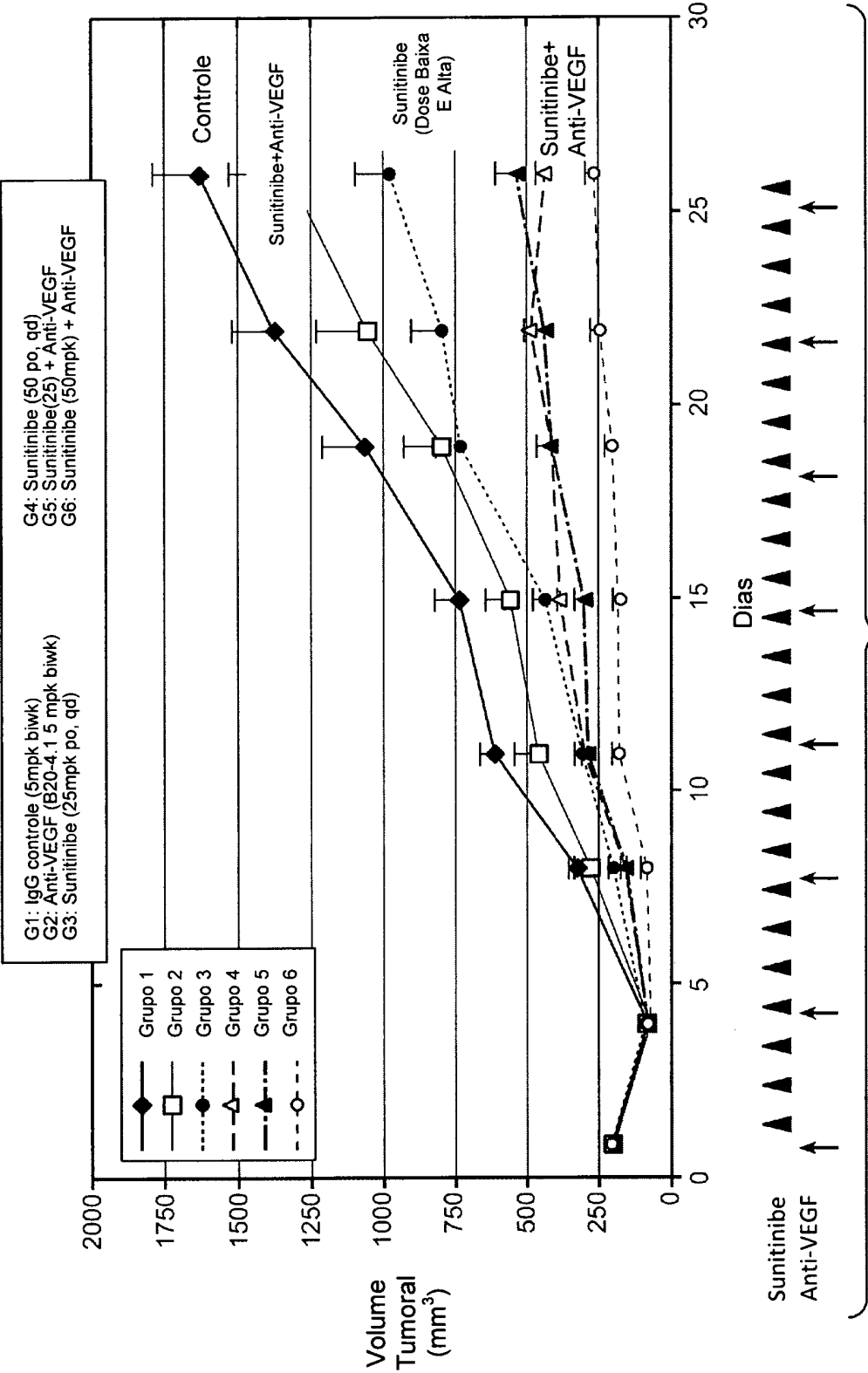


Fig.3

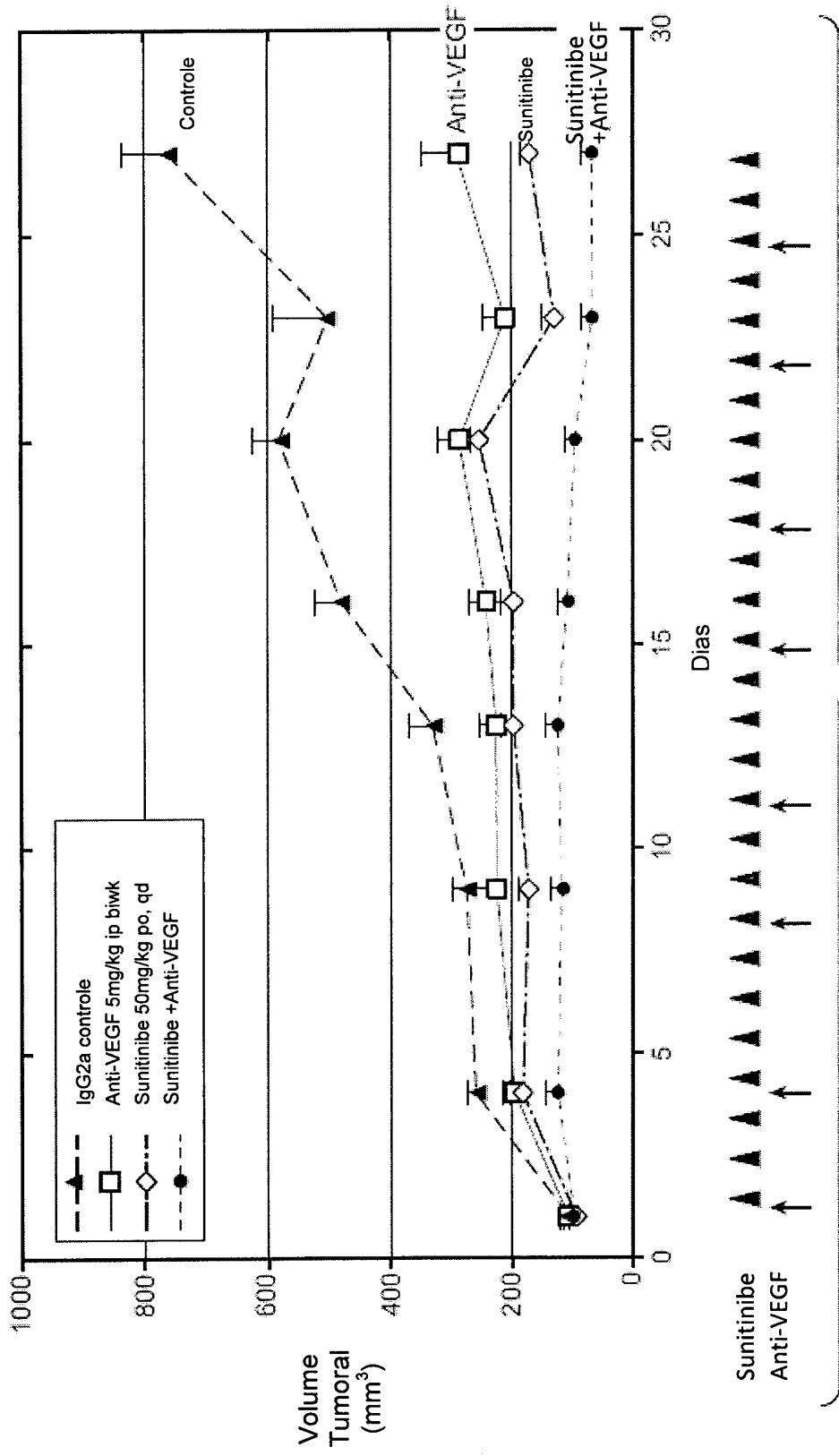


Fig.4

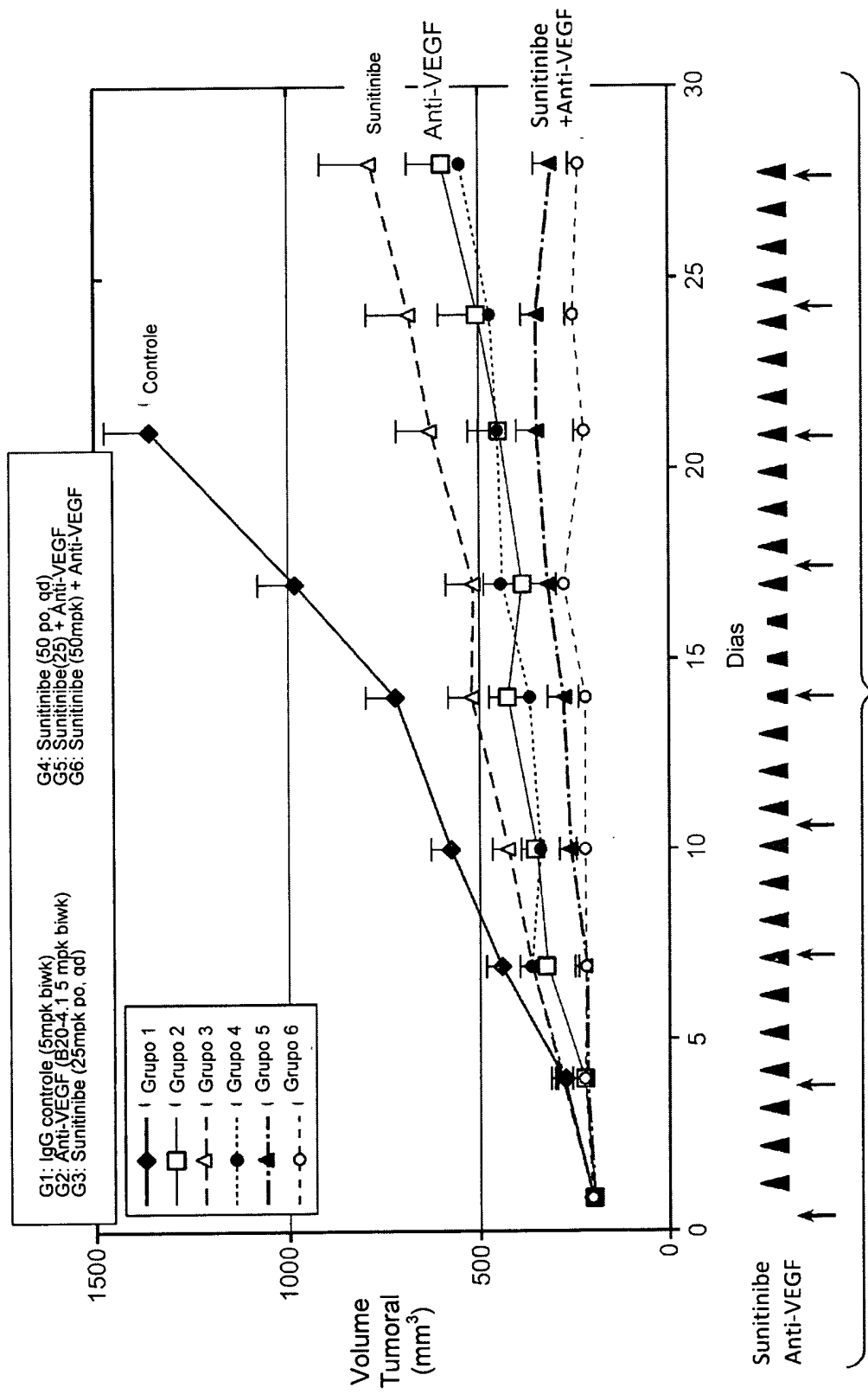


Fig.5A

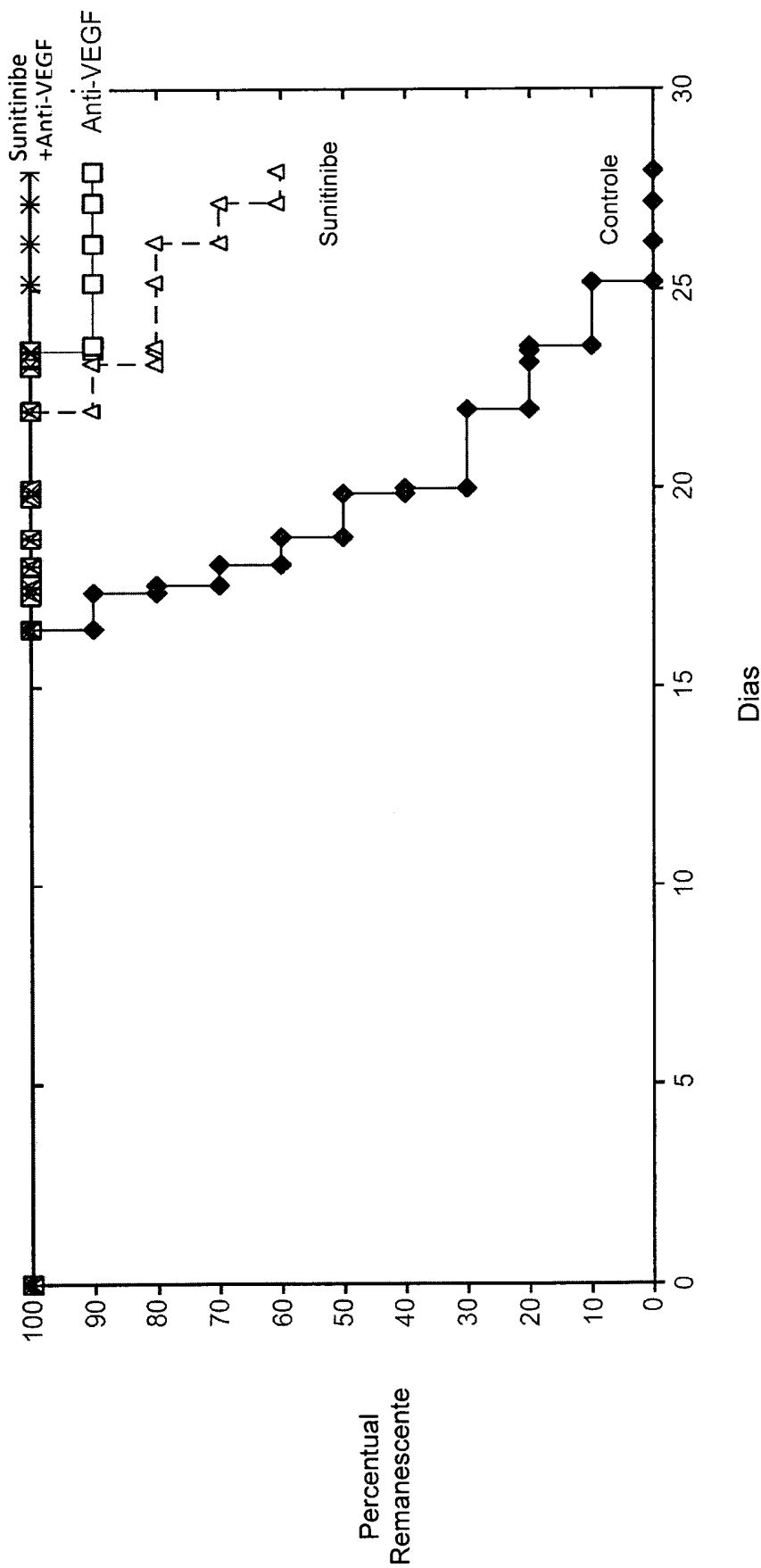


Fig.5B

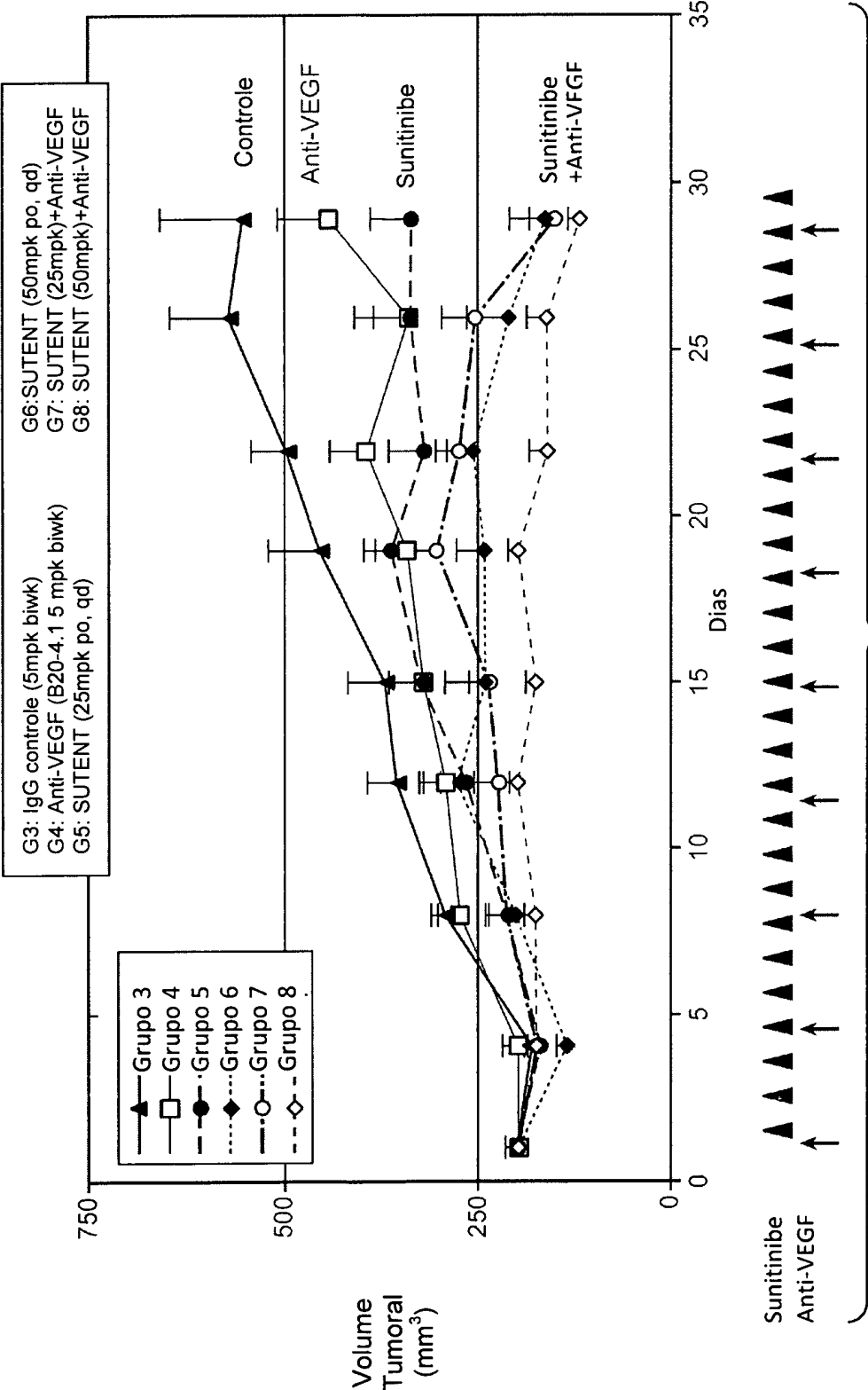


Fig.6

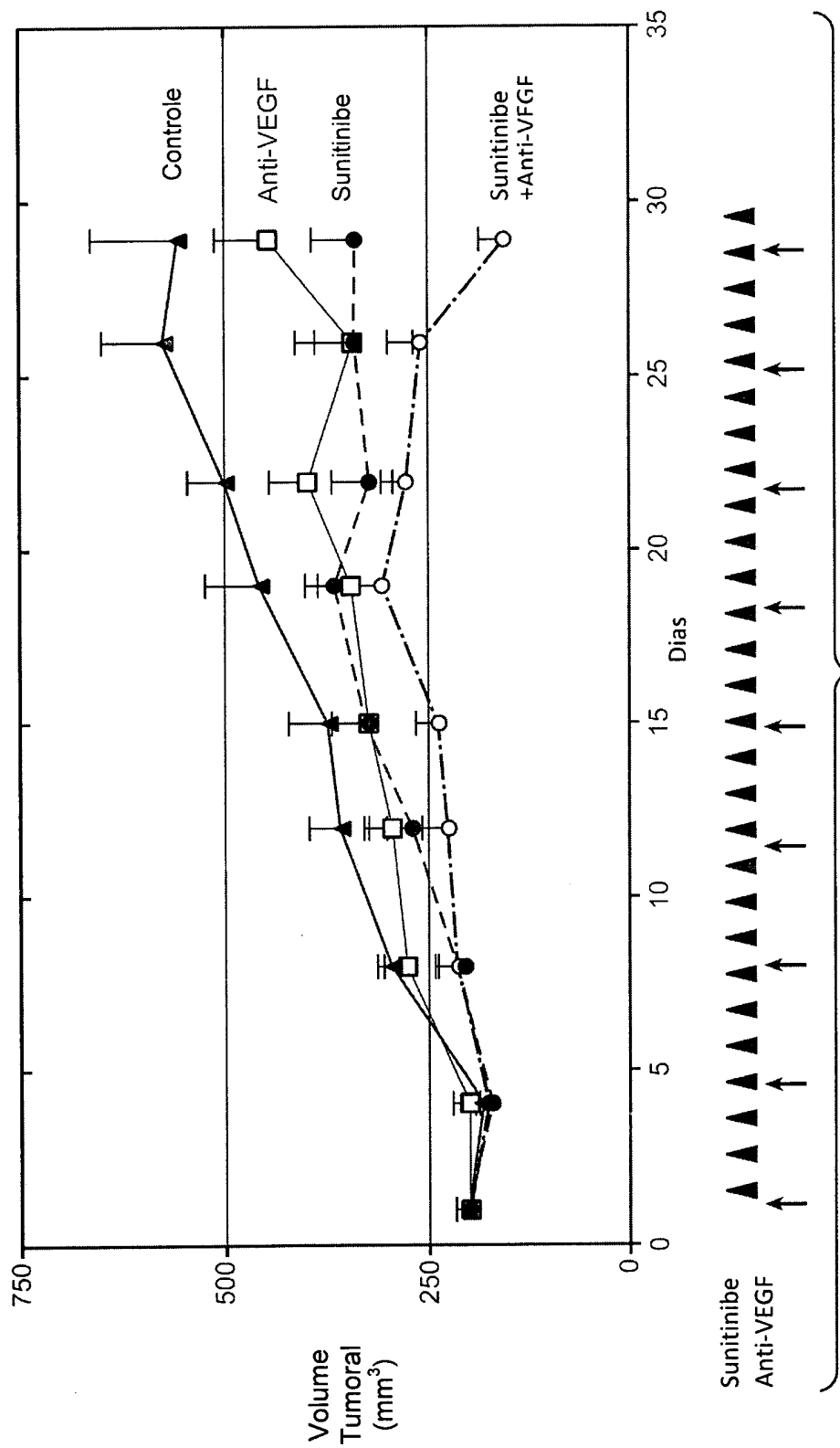


Fig.7A

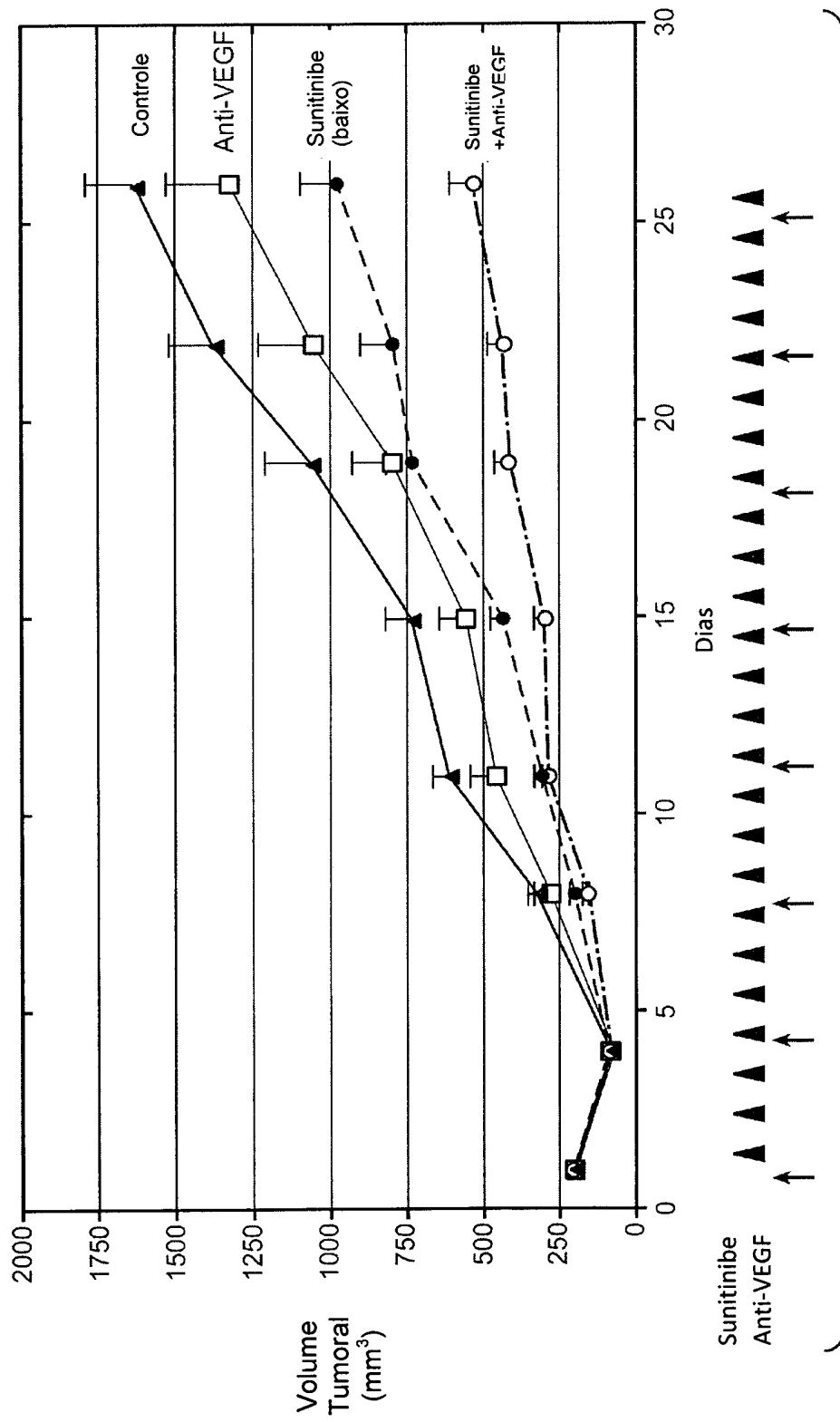


Fig.7B

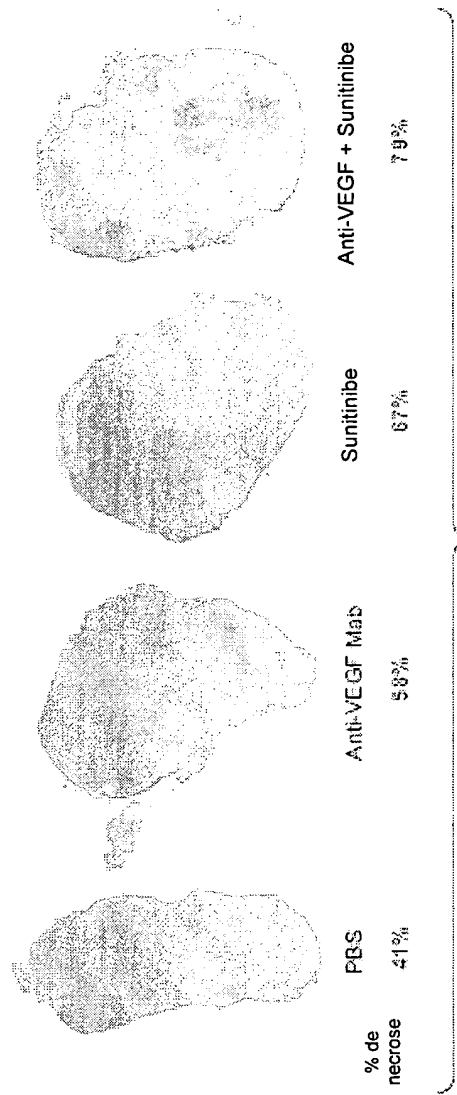
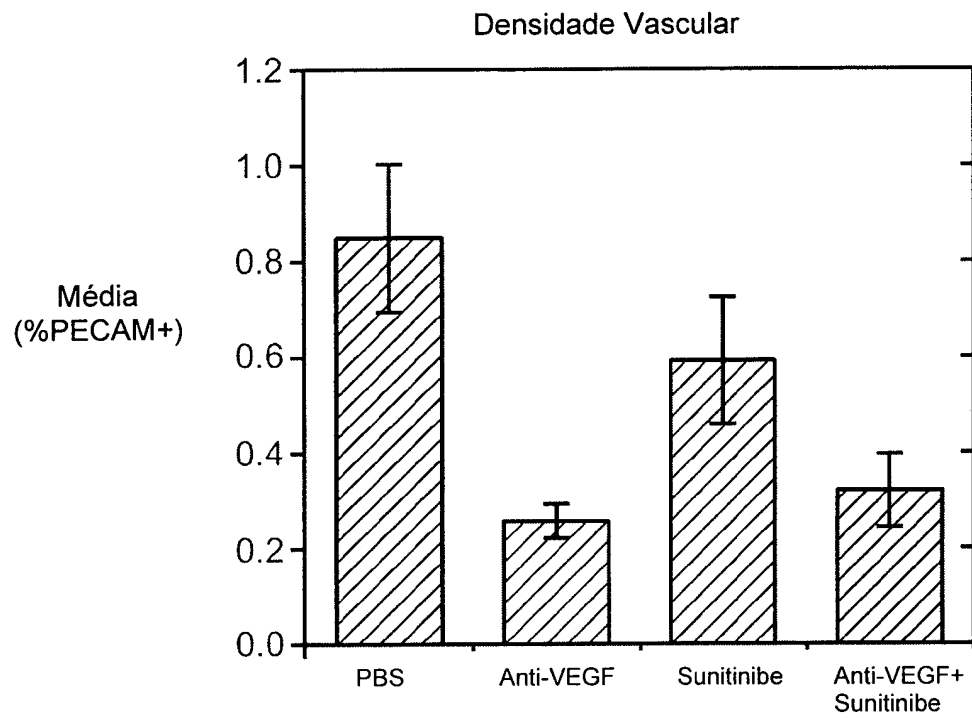
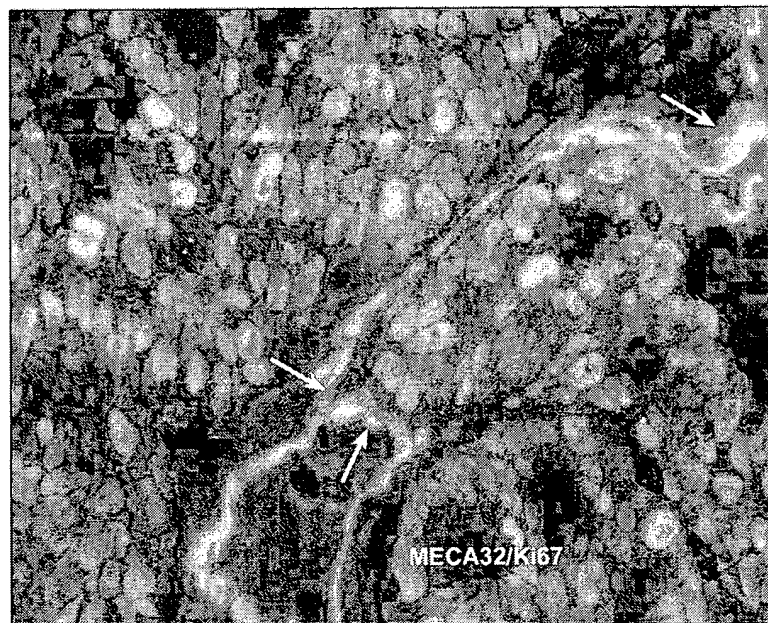


Fig.8A

**Fig.8B****Fig.8C**

RESUMO**“MÉTODO PARA TRATAMENTO DE TUMOR”**

São divulgados no presente pedido métodos para tratamento de tumores usando-se uma combinação de terapia com inibidores da
5 angiogênese.