

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

(21) **PI0709425-6 A2**

(22) Data de Depósito: 28/03/2007
(43) Data da Publicação: 12/07/2011
(RPI 2114)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/22 2006.01
C07K 16/28 2006.01
G01N 33/574 2006.01
A61P 35/00 2006.01

(54) Título: **USO DE UM ANTAGONISTA DO VEGF E MÉTODO IN VITRO PARA DIAGNOSTICAR UM TUMOR RESISTENTE**

(57) Resumo: USO DE UM ANTAGONISTA DO VEGF E MÉTODO IN VITRO PARA DIAGNOSTICAR UM TUMOR RESISTENTE. A presente invenção se refere a métodos para o tratamento de câncer com terapias combinadas que incluem anticorpos anti-VEGF. São também fornecidos métodos para diagnosticar tumores resistentes.

(30) Prioridade Unionista: 29/03/2006 US 30/787.720

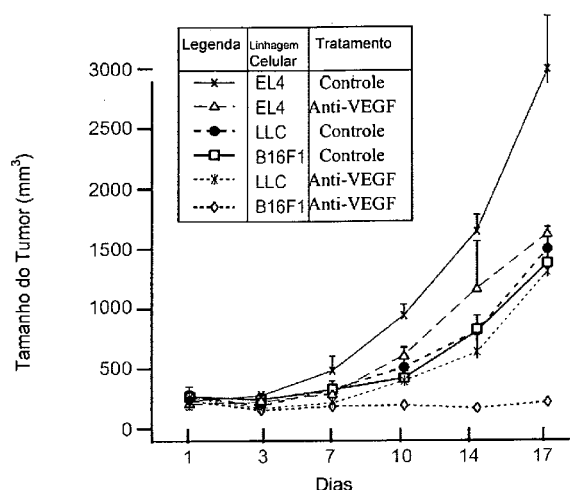
(73) Titular(es): GENENTECH, INC.

(72) Inventor(es): CUILING ZHONG, FARBOD SHOJAEI, HANS - PETER GERBER, MEGAN BALDWIN, NAPOLEONE FERRARA

(74) Procurador(es): PRISCILA PENHA DE BARROS THEREZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2007065377 de 28/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/115045 de 11/10/2007



**“USO DE UM ANTAGONISTA DO VEGF E MÉTODO *IN VITRO* PARA
DIAGNOSTICAR UM TUMOR RESISTENTE”**

Este pedido reivindica prioridade do Pedido Provisório US 60/787.720, depositado em 29 de março de 2006.

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se ao campo do crescimento de tumor e tipo de tumor. A invenção relaciona-se aos inibidores e marcadores para diagnóstico de tumores, e uso destes para o diagnóstico e tratamento de câncer e crescimento de tumor.

10

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Tumores malignos (cânceres) são a causa principal de morte nos Estados Unidos, depois de doenças do coração (ver, por exemplo, Boring *et al.*, *CA Cancer J. Clin.* 43:7 (1993)). O câncer é caracterizado pelo aumento no número de células anormais ou neoplásicas, células derivadas de um tecido normal que se proliferam para formar uma massa tumoral, invasão de tecidos adjacentes por estas células tumorais neoplásicas e a geração de células malignas que eventualmente se espalham, via sistema sanguíneo ou linfático, para linfonodos regionais e para locais distantes, via um processo chamado metástase. Em um estado canceroso, uma célula se prolifera sob condições nas quais as células normais não cresceriam. O câncer se manifesta de diversas formas, caracterizado por diferentes graus de invasão e agressividade.

20

Vários tipos de terapias foram usados para tratar o câncer. Por exemplo, métodos cirúrgicos são usados para remover tecidos mortos ou cancerosos. A radioterapia, que trabalha pelo retrocesso de tumores sólidos, e a quimioterapia, que mata células que se dividem rapidamente, são usadas como terapias contra o câncer. Além disso, agentes anti-angiogênese são uma estratégia efetiva anti-câncer. Estas terapias também estão sendo

25

aprimoradas, ao mesmo tempo em que outras terapias estão sendo desenvolvidas, por exemplo, imunoterapias.

Está agora 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 retinopatias 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 à neoplasia, e para fornecer alimento para o crescimento e 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, foi observada 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 reconhecimento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como um regulador primário da angiogênese em condições patológicas, levou a numerosas tentativas para bloquear as atividades do VEGF. VEGF é um dos reguladores positivos da angiogênese mais potentes e melhor caracterizado. Ver, e.g., Ferrara, N. & Kerbel, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438:967-74 (2005); Além de ser um fator angiogênico na angiogênese e vasculogênese, 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 monócito e influxo de cálcio. Ferrara e Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25. Além disso, estudos relataram que 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. Ver, por exemplo., Guerrin *et al.* *J. Cell Physiol.* 164:385-394 (1995); Oberg-Welsh *et al.* *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132 (1997) e Sondell *et al.* *J. Neurosci.* 19:5731-5740 (1999).

Houve numerosas tentativas de bloqueio das atividades do VEGF. Anticorpos receptores de anti-VEGF inibitórios, construções de receptores solúveis, estratégias *antisense*, aptâmeros de RNA contra VEGF e inibidores de receptor VEGF de tirosina quinase (RTK) de baixo peso molecular foram

todos sugeridos para uso na interferência da sinalização de VEGF. Ver, por exemplo, Siemeister *et al.* *Cancer Metastasis Rev.* 17:241-248 (1998). Anticorpos que neutralizam anti-VEGF mostraram suprimir o crescimento de diversas linhagens celulares de tumor humano 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) e McKently *et al.* *Cancer Res.* 56:921-924 (1996)) e também inibem a angiogênese intra-ocular em modelos de disfunções isquêmicas da retina (Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996)). Realmente, um anticorpo anti-VEGF humanizado, bevacizumabe (AVASTIN®, Genentech, South San Francisco, CA) foi aprovado pela FDA dos EUA como uma terapia de primeira linha para câncer colorretal metastático. Ver, por exemplo, Ferrara *et al.*, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:391-400 (2004).

No entanto, a habilidade de longo prazo dos compostos terapêuticos em interferir no crescimento do tumor é frequentemente limitada pelo desenvolvimento da resistência à droga. Diversos mecanismos de resistência a vários compostos citotóxicos foram identificados e caracterizados funcionalmente, primeiramente em modelos de tumor unicelular. Ver, por exemplo, Longley, D.B. & Johnston, P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205:275-92 (2005). Além disso, interações de células tumorais com estroma do hospedeiro podem estar envolvidas com fenótipos de resistência à droga. Células do estroma secretam uma variedade de fatores pró-angiogênicos e não tendem a ter a mesma instabilidade genética e aumento das taxas de mutação das células tumorais (Kerbel, R.S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 13:31-6 (1991). Revisado por Ferrara & Kerbel e Hazlehurst *et al.* em Ferrara, N. & Kerbel, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438:967-74 (2005); e Hazlehurst, L.A., Landowski,

T.H. & Dalton, W.S. Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene* 22:7396-402 (2003).

Em modelos pré-clínicos, o bloqueio da sinalização do VEGF com o anticorpo monoclonal bevacizumabe humanizado (AVASTIN®, Genentech, South San Francisco, CA) ou o precursor murino para bevacizumab (A4.6.1 (linhagem celular de hibridoma que produz A4.6.1, depositada em 29 de março de 1991, ATCC HB-10709)) inibiu significativamente o crescimento do tumor e reduziu a angiogênese no tumor na maioria dos modelos de xenoenxerto testados (revisado por Gerber & Ferrara em Gerber, H.P. & Ferrara, N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.*, 65:671-80 (2005)). Os efeitos farmacológicos do tratamento com anti-VEGF como agente único foram mais evidentes quando o tratamento começou nos estágios iniciais do crescimento tumoral. Se o tratamento se iniciou quando os tumores já estavam estabelecidos, os efeitos inibitórios foram tipicamente breves e os tumores eventualmente desenvolveram resistência. Ver, por exemplo, Klement, G. *et al.* Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 8:221-32 (2002). Os eventos celulares e moleculares que fundamentam tal resistência ao tratamento com anti-VEGF são complexos. Ver, por exemplo, Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8:299-309 (2005); e Kerbel, R.S. *et al.* Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 20:79-86 (2001). Diversos vetores de expressão podem estar envolvidos. Por exemplo, a combinação do

tratamento com compostos dirigidos ao VEGF e aprimoramento da eficácia de sinalização do fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e atraso no início da resistência em tumores de estágio tardio em um modelo genético de carcinogênese de ilhota pancreática. Ver, Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8:299-309 (2005). Outros pesquisadores identificaram fibroblastos estromais que penetram no tumor, como potente fonte de fatores pró-angiogênicos alternativos. Ver, por exemplo, Dong, J. *et al.* VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *Embo J* 23:2800-10 (2004); e Orimo, A. *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335-48 (2005).

Células inflamatórias podem participar da angiogênese pela secreção de citocinas inflamatórias, que podem afetar a ativação, proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais (revisado em Albini *et al.* e Balkwill *et al.* em Albini, A., Tosetti, F., Benelli, R. & Noonan, D.M. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 65:10637-41 (2005); e Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7 (2005). Diversas células inflamatórias que penetram em tumores secretam fatores pró-angiogênicos, incluindo monócitos e macrófagos (ver, por exemplo, De Palma, M. *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8:211-26 (2005); e Yang, L. *et al.* Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6:409-21 (2004)), linfócitos T e B (ver, por exemplo, Freeman, M.R. *et al.* Peripheral

blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 55:4140-5 (1995)), leucócitos vasculares (ver, por exemplo, Conejo-Garcia, J.R. *et al.* Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. *Blood* 105:679-81 (2005)), células dendríticas (ver, por exemplo, Conejo-Garcia, J.R. *et al.* Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med* 10:950-8 (2004)), neutrófilos (ver, por exemplo, Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D. & Werb, Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103:481-90 (2000)), e mastócitos (ver, por exemplo, Coussens, L.M. *et al.* Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 13:382-97 (1999); e (revisado em de Visser e Coussens em de Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24-37 (2006)). Foi sugerido que células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea (EPCs) (ver, por exemplo, Lyden, D. *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194-201 (2001)) e células progenitoras perivasculares (ver, por exemplo, Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z. & Bergers, G. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol* 7:870-9 (2005)) contribuem para a formação do vasos em alguns modelos experimentais de crescimento tumoral (revisado em Rafii *et al.* em Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K. & Heissig, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2:826-35 (2002)). Células hematopoiéticas de linhagem mielóide, incluindo macrófagos associados a tumores (TAMs), mostraram estimular a angiogênese tanto diretamente, pela

secreção de fatores angiogênicos, como indiretamente, pela produção de proteases de que degradam na matriz extracelular, que em liberações alternadas sequestraram os fatores angiogênicos (revisado em Lewis, C.E. & Pollard, J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* 66:605-612 (2006); e Naldini, A. & Carraro, F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:3-8 (2005)). Entre as linhagens de células mielóides, células progenitoras CD11b+Gr1+ isoladas de baços de camundongos portadores de tumores promoveram a angiogênese quando co-injetadas em células tumorais (ver, por exemplo, Yang, L. *et al.* Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Res* 64:409-21 (2004); e o número de macrófagos que penetram no tumor se correlacionaram com um diagnóstico fraco em alguns tumores humanos (revisado em Balkwill *et al.* em Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7 (2005)). No entanto, em outro estudo, macrófagos inibiram o crescimento de tumores experimentais em camundongos, sugerindo seu potencial como terapia anti-câncer. Ver, por exemplo, Kohchi, C. *et al.* Utilization of macrophages in anticancer therapy: the macrophage network theory. *Anticancer Res* 24:3311-20 (2004).

Apesar da relativa abundância de células mielóides e seu potencial para produzir fatores pró-angiogênicos, seu papel na resistência do tumor ao tratamento com anti-VEGF permanece desconhecido. Há uma necessidade em se descobrir e entender as funções biológicas de células mielóides, tumores resistentes e fatores que eles produzem. A presente invenção se remete a estas e outras necessidades, como serão aparentes pela revisão das divulgações a seguir.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A invenção fornece métodos e composições para diagnóstico e tratamento de tumores resistentes. Além disso, são fornecidos métodos para tratamento de tumor resistente com uma combinação de tratamento. Por exemplo, um método compreende administrar uma quantidade efetiva de um antagonista do VEGF em combinação com uma quantidade efetiva de um segundo agente, para um sujeito com tumor resistente, em que o segundo agente compreende um agente de redução de célula mielóide. O agente de redução de célula mielóide reduz ou remove completamente as células mielóides, por exemplo, células mielóides CD11b+Gr1+. Em certas realizações da invenção, o agente de redução de célula mielóide inclui, mas não se limita a, por exemplo, um antagonista de Gr1, antagonista de CD11b, antagonista de CD18, um inibidor da elastase, antagonista de MCP-1, um antagonista de MIP-1 alfa, clodronato, etc. Em uma realização, o antagonista é um anticorpo.

A invenção também fornece métodos para diagnóstico de tumores resistentes e conjuntos de marcadores para diagnóstico de tumores resistentes. Em certas realizações da invenção, um método inclui diagnosticar um tumor resistente em um sujeito, cujo método compreende fornecer, a partir de um sujeito, uma população de células de teste de um tumor do sujeito ou do sangue do sujeito; medir o número ou a porcentagem de células CD11b+Gr1+ na população de células de teste; comparar o número ou porcentagem das células CD11b+Gr1+ na população de células de teste com o número ou porcentagem das células CD11b+Gr1+ em uma população de células de referência (por exemplo, uma população de células de um tumor sensível ao anti-VEGF); e detectar um aumento no número ou porcentagem de CD11b+Gr1+ na população de células de teste em comparação à população de células de referência, em que o aumento no número ou porcentagem de CD11b+Gr1+ indica que o tumor é o tumor resistente.

Em uma realização, o método compreende, ainda, medir o tamanho do baço do sujeito e comparar o tamanho do baço do sujeito a um tamanho de baço de referência (por exemplo, tamanho de baço do sujeito quando o sujeito não tinha o tumor ou quando o sujeito estava sensível ao tratamento com antagonista do VEGF, ou com banco de dados de outros sujeitos que são sensíveis ao tratamento com antagonista do VEGF), em que o aumento do tamanho do baço indica que o tumor é o tumor resistente. Em ainda outra realização, o método também compreende medir o número ou porcentagem de uma área de superfície vascular (VSA) de um tumor no sujeito, após ter sido administrado ao sujeito um antagonista do VEGF, e comparar o número ou porcentagem da área de superfície vascular do tumor no sujeito com uma área de superfície vascular de referência (por exemplo, uma área de superfície vascular de um tumor sensível ao anti-VEGF), em que um aumento no número ou porcentagem da área de superfície vascular do tumor indica que o tumor é o tumor resistente. Em uma realização, o antagonista é um anticorpo.

Em outra realização da invenção, um método inclui diagnosticar um tumor resistente em um sujeito, cujo método compreende: fornecer, a partir do sujeito, uma população de células para teste de um tumor do sujeito; medir o número ou a porcentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste; comparar o número ou porcentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste com o número ou porcentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de referência; e detectar uma diminuição no número ou porcentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c em comparação à população de células de referência, em que a diminuição no número ou porcentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c indica que o tumor é o tumor

resistente.

Em ainda outra realização, um método inclui diagnosticar um tumor resistente em um sujeito, cujo método compreende: fornecer, a partir do sujeito, uma população de células de teste da medula óssea do sujeito; medir o número ou porcentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste; comparar o número ou porcentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste com o número ou porcentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de referência; e detectar uma diminuição no número ou porcentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste em comparação à população de células de referência, em que a diminuição no número ou porcentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c indica que o tumor é o tumor resistente.

Em outra realização da invenção, um método inclui tratar um tumor resistente em um sujeito com uma combinação de tratamento, cujo método compreende administrar uma quantidade efetiva de um antagonista do VEGF em combinação com uma quantidade efetiva de um agente de redução de célula mielóide e uma quantidade efetiva de um terceiro agente ao sujeito com o tumor resistente, em que o terceiro agente é um agente quimioterápico. Em uma realização, o antagonista é um anticorpo. Em certas realizações da invenção, o agente de redução de célula mielóide inclui, mas não se limita a, por exemplo, um antagonista de Gr1, antagonista de CD11b, antagonista de CD18, um inibidor de elastase, um antagonista de MCP-1, um antagonista de MIP-1 alfa, clodronato, etc. Em ainda outra realização, o agente quimioterápico é 5FU, gencitabina ou um agente quimioterápico listado no presente pedido.

Em uma realização da invenção, um método da invenção inclui fornecer, a partir de um sujeito, uma população de células de teste de um tumor do sujeito; medir a expressão, níveis ou atividade de uma molécula na população de células de teste; comparar a expressão, níveis ou atividade da molécula na população de células de teste com a expressão e/ou atividade da molécula em uma população de células de referência (por exemplo, uma população de células de um tumor sensível ao anti-VEGF); e detectar uma alteração na expressão e/ou atividade da molécula na população de células de teste em comparação à população de células de referência (por exemplo, população de células de referência de um tumor sensível ao tratamento com anti-VEGF), em que a molécula é um ácido nucléico que codifica uma proteína ou a proteína é codificada pelo ácido nucléico, através disso, diagnosticando ou determinando o tumor resistente no sujeito. Em certas realizações, a proteína com a expressão e/ou atividade alterada, inclui, mas não se limita a, por exemplo, IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, THBS1, Crea7, MSCA, MIP2, IL-8R, G-CSF, IL10-R2, THBSP-4 e JAM-2. A alteração na expressão e/ou atividade pode ser em uma ou mais proteínas, duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais, dez ou mais, doze ou mais, treze ou mais, quatorze ou mais, ou em todas as proteínas.

Em certas realizações da invenção, a expressão da molécula é supra-regulada e a proteína inclui, mas não se limita a, por exemplo, IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, MSCA, MIP2, IL-8R e G-CSF. Em certas realizações da invenção, a expressão da molécula é infra-regulada e a proteína inclui, mas não se limita a, por exemplo, THBS1, Crea7, IL10-R2, THBSP-4 e JAM-2.

Como mencionado acima, em certas realizações da invenção, um método inclui fornecer, a partir de um sujeito, uma população de células para

teste de um tumor do sujeito ou do sangue do sujeito; medir o número ou a porcentagem de células CD11b+Gr1+ na população de células de teste; comparar o número ou porcentagem de células CD11b+Gr1+ na população de células de teste com o número ou porcentagem das células CD11b+Gr1+ em uma população de células de referência (por exemplo, uma população de células de um tumor sensível ao anti-VEGF); e detectar um aumento no número ou na porcentagem de CD11b+Gr1+ na população de células de teste em comparação à população de células de referência, em que o aumento no número ou porcentagem de CD11b+Gr1+ indica que o tumor é o tumor resistente. Em uma realização, o método compreende, ainda, detectar uma alteração na expressão ou atividade de uma molécula na população de células de teste em comparação à população de células de referência, em a proteína inclui, mas não se limita a, por exemplo, IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, THBS1 e Crea7. Em certas realizações, há uma alteração na expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas, duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, ou em todas as proteínas.

A invenção também fornece conjuntos de marcadores para identificar tumores resistentes. Por exemplo, um conjunto de marcador pode incluir duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais, dez ou mais, doze ou mais, treze ou mais, quatorze ou mais, ou um conjunto completo de moléculas. A molécula é um ácido nucléico que codifica uma proteína ou uma proteína com uma expressão e/ou atividade alterada, e é selecionada destes a seguir: IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, THBS1, Crea7, MSCA, MIP2, IL-8R, G-CSF, IL10-R2, THBSP-4 e JAM-2. Em uma realização, as moléculas são derivadas de células CD11b+Gr1+ e incluem, por exemplo, IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, THBS1 e Crea7. Em outra realização, as moléculas são derivadas de tumores resistentes e incluem, por exemplo, MSCA, MIP2, IL-8R,

G-CSF, IL10-R2, THBSP-4 e JAM-2.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1 Painéis a-f ilustram a resistência de linhagens celulares de tumor singênicos ao tratamento com anti-VEGF relacionados com seu potencial para recrutar BMMNCs. (a) Curvas de crescimento de tumores LLC, EL4 e B16F1 de xenoenxerto na medula óssea de camundongos quiméricos C57BL/6, GFP tratados com o anticorpo G6-23 anti-VEGF ou um anticorpo controle (anti-erva de Santiago) (n = 5). O tratamento foi iniciado no segundo dia após administração intraperitoneal (IP) do anticorpo controle, G6-23 a 10 mg/kg, duas vezes por semana. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão de um experimento representativo de três experimentos diferentes. (b) Crescimento de tumores EL4 em camundongos nus bege XID (n = 10) tratados com controle (10 e 50 mg/kg, IP, duas vezes por semana) ou G6-23 (10 e 50 mg/kg, IP, duas vezes por semana). O tratamento foi iniciado no dia 1 após implantação de célula tumoral. A análise estatística foi avaliada usando-se o programa ANOVA, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,005$. (b) Crescimento de tumores LLC (n = 10) em camundongos nus bege XID para (b), G6-23 (10 e 100 mg/kg) e controle (100 mg/kg), administrados IP, duas vezes por semana, respectivamente. (d) análise FACS de suspensão de células tumorais B16F1, EL4 e LLC tratadas por 14 dias (n = 4). Aumento do número de GFP+ em BMMNCs em tumores EL4 e LLC tratados com anti-VEGF foi identificado, relativo a tumores B16F1. (e) Coloração imunofluorescente de células CD31+ e GFP+ em cortes de tumor EL4, LLC e B16F1 tratados por 14 dias, tanto com um controle como com anticorpo anti-VEGF. Redução significativa nas quantidades de CD31+ nos vasos e presença reduzida de células GFP+ no estroma de tumores B16F1 foram identificadas em comparação com tumores EL4 e LLC. Os dados apresentados são de um corte representativo por grupo de três experimentos independentes. (f) Quantificação da área de superfície

vascular (VSA) em xenoenxertos de tumor tratados por 14 dias. Tumores B16F1 tratados com anti-VEGF exibiram reduções maiores na área de superfície vascular do que tumores LLC ou EL4. Os dados apresentados são as médias \pm desvio padrão das médias dos cortes 9 a 15 de 3 a 5 tumores por grupo de tratamento.

Fig. 2 Painéis a-d ilustram experimentos com mistura de tumores e curvas de crescimento de tumores B16F1 misturados com GFP+ isolados da medula óssea e tumor de camundongo quimérico GFP. (a) Crescimento de $2,5 \times 10^6$ células tumorais B16F1 quando misturadas com 10^6 BMMNCs isoladas de camundongos portadores de tumores EL4, LLC, ou B16F1 e tratados com anticorpo controle. Como um controle, BMMNCs de camundongos implantados com matrigel ou camundongos controle são mostrados. (n=5) (b) Curvas de crescimento tumoral de tumores B16F1 misturados com GFP+ de BMMNCs isoladas de camundongos portadores de tumores EL4, LLC ou B16F1 e tratados com anticorpo anti-VEGF. Células GFP+ de medula óssea derivadas de tumor EL4 e LLC significativamente aumentou o crescimento de tumores B16F1 sensíveis ao anti-VEGF (n = 4). Os dados apresentados em (a) e (b) são de um experimento representativo de pelo menos dois experimentos independentes. (c e d) Crescimento 2×10^6 de tumores B16F1 quando misturados com 5×10^5 células GFP positivas de tumores EL4, LLC or B16F1 com 14 dias, tratados tanto com anticorpo controle (c) como com anti-VEGF, G6-23 (d).

Fig. 3 Painéis a-d ilustram as análises de frequência de CD11b, célula Gr1 em experimentos de migração celular *in vitro*, tumor e medula óssea *in vivo* e seus papéis funcionais em mediar resistência ao anti-VEGF. Células CD11b+Gr1+ isoladas de camundongos portadores de tumores EL4 e LLC são uma população principal de célula BM que media resistência ao tratamento com anti-VEGF. (a) Número de células CD11b+Gr1+ positivas que migram de

BMMNCs isolado fresco após exposição ao meio condicionado do controle ou dos tumores EL4, LLC ou B16F1 tratados com anti-VEGF. Ambos os tumores resistentes ao anti-VEGF (EL4, LLC) induzem migração independente de VEGF. (b) Análise de multilinhagens de tumores isolados de camundongos implantados com tumores EL4, LLC e B16F1 e tratados com controle ou anti-VEGF. Os tumores EL4 e LLC, mas não os tumores B16F1, exibem um aumento significativo nas células CD11b+Gr1+. Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (b) Análise de multilinhagens de tumores e medula óssea, isolados de camundongos implantados com tumores EL4, LLC e B16F1. Ao contrário dos tumores isolados (Fig. 3b), não houve aumento consistente de células CD11b+ ou Gr1+ na medula óssea de camundongos portadores de tumores. Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (d) Curvas de crescimento de tumores B16F1 misturados com EL4- e LLC-preparados, células CD11b+Gr1+ derivadas da medula óssea e tratadas com anti-VEGF (G6-23, n = 5 por grupo). Células CD11b+Gr1+ são necessárias e suficientes para mediar resistência, como BMMNCs depletado de células CD11b+Gr1+ exibiu potencial reduzido para mediar resistência. Os dados apresentados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes. (e & f) Curva de crescimento de células B16F1 misturadas com células CD11b+Gr1+ associadas com tumor, isoladas de camundongos portadores de tumores EL4 (e) e LLC (f). Cerca de, 3×10^5 FACS classificaram células CD11b+Gr1+ isoladas de camundongos portadores de tumores EL4 ou LLC, foram misturadas com células 3×10^6 B16F1 e foram implantadas em camundongos C57BL/6 (n=5).

Fig. 4 Painéis a-d ilustram a análise da expressão gênica de células da medula óssea e de tumores isolados. (a) Análise de dados da expressão gênica de grupo, sem supervisão, de células CD11b+Gr1+, isoladas

da medula óssea de camundongos implantados com tumores EL4 resistentes ao anti-VEGF (ER1-3), LLC (LR1-3) ou B16F1 sensíveis ao anti-VEGF (BR1-3) tratados com anti-VEGF. Para abordagem de agrupamento hierárquico, os dados foram normalizados àqueles dos camundongos controle implantados com matrigel. Genes infra-regulados, sem alteração e supra-regulados estão apresentados. Um conjunto de características de alterações induzidas por tumores resistentes ao anti-VEGF, que é diferente daquela induzida por tumores sensíveis ao anti-VEGF, pode ser identificado. (b) Exibição de genes que podem estar envolvidos na regulação da angiogênese ou diferenciação e migração de célula mielóide, com alterações significativas ($p = 0,05$, > 2 vezes) nos níveis de expressão nas células CD11b+Gr1+ na medula óssea, entre tumores resistentes ao anti-VEGF e tumores sensíveis tratados com anti-VEGF por 17 dias. (c) Análise de dados da expressão gênica de grupos sem supervisão, gerados de RNA isolado de tumores EL4, LLC e B16F1 após tratamento com G6-23 por 17 dias. (b) Exibição de genes potencialmente envolvidos na regulação da angiogênese e/ou diferenciação e migração de célula mielóide com alterações significativas nos níveis de expressão ($p \leq 0,05$, alteração > 2 vezes) em ambos os tumores resistentes ao anti-VEGF (EL4=ER1-3, LLC=LR1-3) relativo aos tumores B16F1 (BR1-3), seguindo tratamento com G6-23 por 17 dias.

Fig. 5 Painéis a-f ilustram os efeitos da combinação de anti-VEGF com um anticorpo dirigido a Gr1+células mielóides (anti-Gr1) no crescimento de tumores EL4 e LLC. (a) Curvas de crescimento de tumores EL4 tratados com anti-VEGF, ($n = 5$) ou anti-Gr1 ($n = 4$), tanto isoladamente como em combinação (combinação anti-VEGF + anti-Gr1). O número de animais destes grupos é de 3 a 4. (b) Quantificação da área de superfície vascular (VSA) por IHC, frequência de células Gr1+ na periferia e nos tumores e células endoteliais (EC) CD31+ por FACS e pesos dos tumores terminais EL4

tratados por 17 dias, conforme descrito em (a). Ao contrário da redução quase que completa nas células Gr1 circulatórias, encontrou-se uma redução de 2 a 3 vezes nos tumores de camundongos tratados com anti-Gr1. Foi identificada uma diferença estatisticamente significativa nos pesos dos tumores terminais entre os tumores EL4 com anti-VEGF isoladamente e em combinação com anti-GR1 Mab. Os dados são as médias \pm SEM de um experimento representativo de pelo menos dois experimentos independentes. (a) Curvas de crescimento de tumores LLC tratados com anti-VEGF ($n = 5$) ou anti-Gr1 ($n = 4$), tanto isoladamente como em combinação ($n=4$). (b) Quantificação da área de superfície vascular (VSA) por IHC, frequência de células Gr1+ na periferia e células endoteliais (EC) Gr1+ CD31+ nos tumores por FACS e pesos dos tumores nos animais tratados. Houve uma diferença estatisticamente significativa nos volumes dos tumores e VSA entre os tumores LLC tratados com anti-VEGF isoladamente e em combinação com anti-GR1 (c). Os dados são as médias \pm SEM de um experimento representativo de pelo menos dois experimentos independentes. (e & f) inibidor de elastase em combinação com tratamento anti-VEGF atrasa a resistência do tumor em tumores EL4 (e) e LLC (f). Os volumes tumorais na combinação de tratamento foram significativamente menores quando comparados ao grupo anti-VEGF. Os dados apresentados na Fig. 5 são as médias \pm desvio padrão de um experimento representativo de pelo menos dois experimentos independentes. A análise estatística foi avaliada pelo programa ANOVA, indicaram $p \leq 0,05$, **indicou $p < p \leq 0,01$.

Fig. 6 Painéis a-b ilustram a estratégia experimental usada para investigar o papel de BMMNCs em tumores resistentes ao tratamento com anti-VEGF e o isolamento de células GFP+ do tumor ou da medula óssea de animais experimentais. **Painel a** ilustra esquematicamente a estratégia experimental para investigar o papel de BMMNCs em tumores resistentes

contra o tratamento com anti-VEGF. O monitor de cinética de recrutamento de BMMNCs em estudos de xenoenxerto, GFP+BMMNCs foram injetadas IV nos camundongos C57Bl/6 irradiados de forma letal. Em seguida, os camundongos quiméricos foram preparados pela implantação de tumores em matrigel sensíveis (B16F1) e resistentes (EL4 e LLC) (all.). Células GFP+ foram isoladas de camundongos quiméricos, tanto da medula óssea (all.) como de tumores (alV.), misturadas com células B16F1 e injetadas (SC) em camundongos C57BL/6. Os animais implantados com tumores foram tratados com anti-VEGF ou anticorpos controle (aV.), com o objetivo de determinar o papel de BMMNCs na mediação da resistência do tumor contra o tratamento com anti-VEGF. **Painel b** ilustra o isolamento de células GFP+ do tumor e da medula óssea de camundongos implantados. Usando-se seleção por FACS, as células GFP+ tanto do tumor como da medula óssea de camundongos implantados (etapa all. da estratégia) foram isoladas (bl.). A análise pós-seleção (bll.) foi usada para determinar a pureza das células GFP+ isoladas do tumor e da medula óssea de animais experimentais.

Fig. 7 ilustra a purificação de CD11bGr1 da medula óssea de camundongos implantados com tumores EL4 e LLC. BMMNCs foram isoladas de camundongos C57BL/6 implantados com células EL4 ou LLC. BMMNCs foram incubadas com esferas conjugadas com anti-CD11b e passadas através de colunas magnéticas de larga escala para isolar frações CD11b+ e CD11b-. As células de cada fração, bem como uma alíquota de células não selecionadas foram coradas com anticorpos conjugados com fluorocromo CD11b e Gr1 para determinar a pureza das células.

Fig. 8 ilustra o perfil de eluição de lisados de tumor linfoma de camundongos resistentes ao tratamento com anti-VEGF, que foram tratados com anticorpo anti-VEGF (G6-31) e carregados em uma coluna HiTrap HS. A coluna foi eluída passo a passo com aumento da concentração de sal.

Fig. 9 ilustra uma alteração no tamanho do tumor EL4 em camundongos, após 72 horas do recebimento de uma dose de 1) lipossomo/erva-de-santiago em PBS, 2) lipossomo/G6-31 em PBS; 3) lipossomo de clodronato /G6-23, 4) lipossomo de clodronato/G6-31 ou 5) lipossomo de clodronato/PBS na veia da cauda.

Fig. 10 ilustra uma diminuição da expressão do mRNA do VEGF em camundongos que têm tumores resistentes ao tratamento com anti-VEGF, quando o lipossomo de clodronato foi administrado ao camundongo em combinação com anti-VEGF (G6-23).

Fig. 11 ilustra uma diminuição nos níveis de KC em camundongos que têm tumores resistentes ao tratamento com anti-VEGF, tratados com lipossomo de e anti-VEGF (G6-23).

Fig. 12, painéis A e B, ilustram que tanto MIP-1alfa (**Painel A**) como MCP-1 (**Painel B**) são expressos em linhagens de células tumorais resistentes ao tratamento com anti-VEGF, onde Dil(+) são células endoteliais, CD3(+) representa células linfoides e F4/80(+) representa macrófagos.

Fig. 13, painéis A e B, ilustram que MIP-1 alfa e MCP-1 têm atividade angiogênica em um teste de brotamento angiogênico e formação do lúmen capilar. **Painel A** ilustra controle de células endoteliais, onde as esferas foram tratadas com VEGF e D551 por 10 dias. **Painel B** ilustra células endoteliais tratadas com D551 (controle negativo) (superior esquerdo), VEGF (controle negativo) (superior direito), 1,25 µg/mL de MCP-1 e D551 (inferior esquerdo), e 1,25 µg/mL de MIP-1alfa e D551 (inferior direito).

Figura 14 ilustra análise das linhagens BMNNCs de camundongos portadores de tumores (B16F1 (**a**), EL4 (**b**) e LL2 (**c**)) no dia 7 (p1) e no dia 14 (p2) do tratamento, tanto com controle como com o anticorpo G6-23 anti-VEGF. As inserções representam células carregadas para CD11b. O tratamento com anti-VEGF aumentou os níveis de células CD11b+ e Gr1+,

mas nenhum dos outros tipos celulares analisados. Tipos celulares que tiveram aumento entre os dias 7 e 14 foram as células CXCR4+, CD11b+, CD31+ e CD11b+, CD31+. Ao contrário, foi encontrada uma redução nas células CD19+ (linfócitos B) e CD90+ (linfócitos T) em LL2 e EL4, mas não tumores B16F1, entre os dias 7 e 14.

Figura 15 ilustra análise multilinhagem de células GFP+ no tumor e BM em camundongos portadores de tumores resistentes e sensíveis. Camundongos C57Bl/6 foram injetados com tumores TIB6, B16F1, EL4 e LLC e foram tratados com anticorpos anti-VEGF ou controle, conforme descrito. BMMNCs e tumores isolados foram coletados de cada camundongo e foram corados com anticorpos contra CD19 (linfóide B), CD90 (linfóide T), CD11c (dendrítica) e também receptores do VEGF (R1 e R2). Os gráficos representam a frequência de cada subgrupo nos tumores **(a)** e nos compartimentos da medula óssea **(b)**.

Figura 16. O baço é um local alternativo de instalação para células CD11b+Gr1+ em camundongos portadores de tumores resistentes. Camundongos quiméricos C57Bl/6-GFP foram implantados com tumores TIB6, B16F1, EL4 e LLC e foram tratados com anticorpos anti-VEGF ou controle por 17 dias, conforme descrito. **(a)** Análise de animais que produzem tumores revelou um aumento significativo ($p \leq 0.05$) no tamanho dos baços em camundongos portadores de tumores resistentes. **(b)** Os esplenócitos foram coletados de cada camundongo usando-se ruptura mecânica e foram tratados com tampão de lise para remover os glóbulos vermelhos. As células do baço foram então coradas com anticorpos anti-CD11b e anti-Gr1 e foram analisadas em uma máquina FACS para investigar a frequência de células CD11b+Gr1+. A análise dos dados indica um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na frequência das células CD11b+Gr1+ no baço de camundongos portadores de tumores resistentes, em comparação aos tumores sensíveis.

* Indica a diferença significativa ($p \leq 0,05$) em camundongos portadores de tumor EL4, tratados com anti-VEGF em comparação aos animais correspondentes tratados com B16F1 e TIB6. + Indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) em camundongos portadores de tumor LLC, tratados com anti-VEGF em comparação aos animais tratados com B16F1 e TIB6.

Figura 17 ilustra que **(a)** somente as células mielóides isoladas de camundongos preparados com tumores resistentes são capazes de mediar resistência ao anti-VEGF. Os gráficos representam as curvas de crescimento de tumores B16F1 misturados com B16F1 ou preparados com matrigel, células CD11b+Gr1+ derivadas da medula óssea e tratadas com anti-VEGF ($n = 5$ por grupo). O volume do tumor foi medido por 21 dias, como descrito. **(b)** A indução da angiogênese é um dos mecanismos pelo qual as células CD11b+Gr1+ desenvolvem resistência ao tratamento com anti-VEGF. VSA foi analisada em camundongos que abrigam a mistura de células B16F1 e CD11b+Gr1+ ou células CD11b-Gr1-. * Indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) na comparação da mistura de células B16F1 e células CD11b+Gr1+ de camundongos preparados com EL4 ou LLC à mistura B16F1 com células CD11b-Gr1- isoladas dos mesmos animais preparados.

Figura 18 ilustra mecanismos diferentes que dirigem a resistência ao anti-VEGF e agentes quimioterápicos. Camundongos C57Bl/6 ($n=5$) foram implantados com tumores EL4 **(a)**, LLC **(b)**, TIB6 **(c)** e B16F1 **(d)** e foram tratados com anticorpos anti-VEGF, anticorpo controle, Gencitabina e 5FU, como descrito. O volume do tumor foi medido duas vezes por semana e todos os camundongos foram analisados no dia 17. * indica uma diferença significativa na comparação de camundongos tratados com anti-VEGF e animais tratados com 5FU ou Gencitabina. **(e)** Células BM foram isoladas de cada camundongo e foram coradas com CD11b e anticorpos conjugados com fluorocromo Gr1. O gráfico representa o número de células BM CD11b+Gr1+ em

cada tratamento. (f) Tumor isolado de cada camundongo, coletado após 17 dias e corado com os mesmos anticorpos para observação da frequência e do número de células CD11b+Gr1+ em cada tumor. As barras representam a média \pm SEM. * Indica a diferença significativa ($p \leq 0,05$) em camundongos portadores de tumor EL4, tratados com anti-VEGF em comparação aos animais correspondentes tratados com B16F1 e TIB6. + Indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) em camundongos portadores de tumor LLC, tratados com anti-VEGF em comparação aos animais correspondentes tratados com B16F1 e TIB6.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

Antes da descrição em detalhes da presente invenção, deve-se entender que esta invenção não está limitada a composições específicas ou sistemas biológicos, que podem, é claro, variar. Entende-se também que a terminologia usada no presente pedido é somente para os propósitos das realizações específicas descritas, e não tem a intenção de ser limitante. Como usado nesta especificação e nas especificações anexas, as formas no singular "um", "uma" e "o/a" incluem os plurais referentes, a menos que o conteúdo claramente dite de outra forma. Dessa forma, por exemplo, a referência a "uma molécula" opcionalmente inclui uma combinação de duas ou mais de tais moléculas e similares.

Os termos "VEGF" e "VEGF-A" são usados alternadamente para se referir ao fator de crescimento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos e fatores de crescimento celular endotelial vascular relacionados de 121, 189 e 206 aminoácidos, como descrito por Leung *et al. Science*, 246:1306 (1989), e Houck *et al. Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991) e Robinson & Stringer, *Journal of Cell Science*, 144(5):853-865 (2001), junto com as formas alélicas que ocorrem naturalmente 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 PlGF. VEGF-A primeiramente se liga 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. 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 17 de aminoácido (metionina) no VEGF nativo truncado é também 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.

Um "antagonista do VEGF" refere-se a uma molécula (peptidil ou 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. Antagonistas do VEGF incluem 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 para um ou mais receptores (por exemplo, proteínas receptoras do VEGF solúveis, fragmentos de ligação ao VEGF destas ou proteínas receptoras do VEGF quiméricas), anticorpos receptores anti-VEGF e antagonistas de receptores do

VEGF, como inibidores de molécula pequena de VEGFR tirosina quinases e proteínas de fusão, por exemplo, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF₁₂₁-gelonina (Peregine). Antagonistas do VEGF também incluem antagonistas variantes do VEGF, moléculas *antisense* dirigidas ao VEGF, aptâmeros de RNA e ribozimas contra VEGF ou receptores do VEGF. Antagonistas do VEGF úteis nos métodos da invenção incluem, ainda, compostos peptídil ou não peptídil 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; oligômeros de nucleobase *antisense* complementares a pelos menos um fragmento de uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo VEGF; pequenos RNAs complementares a pelos menos um fragmento de uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo VEGF; ribozimas que se direcionam ao VEGF; corpos peptídicos para VEGF; e aptâmeros de VEGF. Em uma realização, 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 inibido pelo antagonista do VEGF é VEGF (8-109), VEGF (1-109) ou VEGF₁₆₅.

Os termos “anticorpo anti-VEGF” ou “um anticorpo que se liga ao VEGF” refere-se a um anticorpo que é capaz de se ligar ao VEGF com afinidade e especificidade suficientes para que o anticorpo seja útil como um agente de diagnóstico e/ou terapêutico em atingir o VEGF. Por exemplo, 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. Ver, por exemplo, patentes US 6.582.959, 6.703.020; documento WO 98/45332; documento WO 96/30046; documento WO 94/10202, documento WO 2005/044853; patente EP 0666868B1; pedidos de patente US 20030206899, US 20030190317, US 20030203409, US

20050112126, US 20050186208 e US 20050112126; Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004) e documento WO 2005012359. 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. O anticorpo pode ser sujeito 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 de HUVEC; testes de inibição de crescimento de célula tumoral (como 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, VEGF-C, VEGF-D ou VEGF-E, nem a outros fatores como P1GF, PDGF ou bFGF. Em uma realização, os anticorpos anti-VEGF preferidos incluem um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epitopo 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 Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599, incluindo, mas se limitando ao anticorpo conhecido como "bevacizumabe (BV)," também conhecido como "rhuMAb VEGF" ou "AVASTIN®". Bevacizumabe compreende regiões de estrutura IgG1 humana mutantes e regiões determinantes de complementaridade de ligação de antígeno do anticorpo monoclonal anti-hVEGF murino A4.6.1 que bloqueia a

ligação de VEGF humano aos seus receptores. Cerca de 93% da sequência de aminoácido de bevacizumabe, incluindo a maioria das regiões de estrutura, é derivada de IgG1 humana, e cerca de 7% da sequência é derivada do anticorpo A4.6.1. murino. Bevacizumabe tem um peso molecular de cerca de 149.000 daltons e é glicosilado. 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 preferidos incluem o G6 ou os anticorpos da série B20 (por exemplo, G6-23, G6-31, B20-4.1), como descrito na Publicação de Pedido PCT documento WO 2005/012359. Para anticorpos adicionais preferidos ver patentes US 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020, 6.054.297; documentos WO 96/03430, documento WO 96/30046; documento WO94/10202; patente EP 30046/00195; ou Publicação de Pedido de Patente US 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, and 20050112126 e Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004).

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, 24-26 e 34-35 da Publicação de Pedido PCT documento WO 2005/012359.

Uma "célula progenitora/tronco hematopoiética" ou "célula hematopoiética primitiva" é aquela capaz de se diferenciar para formar um tipo celular sanguíneo maduro ou mais comprometido. "Linhagens celulares sanguíneas linfoides" são aquelas células precursoras hematopoiéticas capazes de se diferenciar para formar linfócitos (células B ou células T). Da mesma forma, "linfopoiese" é a formação de linfócitos. "Linhagens celulares sanguíneas eritróides" são aquelas células precursoras hematopoiéticas capazes de se diferenciar para formar eritrócitos (glóbulos vermelhos) e "eritropoiese" é a formação de eritrócitos.

A frase "linhagens celulares sanguíneas mielóides", para os propósitos da presente invenção, abrange todas as células progenitoras hematopoiéticas, exceto linhagens celulares sanguíneas linfóides e eritróides, como definido acima, e "mielopoiese" envolve a formação de células sanguíneas (exceto linfócitos e eritrócitos).

Uma população de células mielóides pode ser aprimorada para células imunes mielóides que são Gr1+/CD11b+ (ou CD11b+Gr1+) ou Gr1+/Mac-1+. Essas células expressam um marcador para células mielóides da linhagem de macrófago, CD11b e um marcador para granulócito, Gr1. Uma Gr1+/CD11b+ pode ser selecionada por panorama imunoaderente, por exemplo, com um anticorpo para Gr1+.

Um "agente de redução de célula mielóide" ou "agente que reduz célula mielóide" refere-se a um agente que reduz ou remove uma população de célula mielóide. Tipicamente, o agente que reduz célula mielóide reduzirá ou removerá células mielóides, CD11b+Gr1+, monócitos, macrófagos, etc. Exemplos de agentes que reduzem célula mielóide incluem, mas não se limitam a, antagonista de Gr1, antagonista de CD11b, antagonista de CD18, um inibidor de elastase, antagonista de MCP-1, um antagonista de MIP-1 alfa, etc.

O termo "antagonista de Gr1" quando usado no presente pedido refere-se a uma molécula que se liga a Gr1 e inibe ou reduz substancialmente uma atividade biológica de Gr1. Exemplos não limitantes de antagonistas de Gr1 incluem anticorpos, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas bio-orgânicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos e seus metabólitos, sequências controle de transcrição e tradução, e similares. Em uma realização da invenção, o antagonista de Gr1 é um anticorpo, especialmente um anticorpo anti-Gr1 que se liga ao Gr1 humano.

O termo "antagonista de CD11b" quando usado no presente pedido refere-se a uma molécula que se liga a CD11b e inibe ou reduz substancialmente uma atividade biológica de CD11b. Normalmente, o antagonista irá bloquear (parcialmente ou completamente) a habilidade de uma célula (por exemplo, célula mielóide imatura) que expressa a subunidade CD11 em sua superfície celular para se ligar ao endotélio. Exemplos não limitantes de antagonistas de CD11b incluem anticorpos, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas bio-orgânicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos e seus metabólitos, sequências controle de transcrição e tradução, e similares. Em uma realização da invenção, o antagonista de CD11b é um anticorpo, especialmente um anticorpo anti-CD11b que se liga ao CD11b humano. Anticorpos CD11b exemplares incluem MY904 (patente US 4.840.793), 1B6c (ver Zhang *et al.*, *Brain Research* 698:79-85 (1995)), CBRN1/5 e CBRM1/19 (documento WO 94/08620).

O termo "antagonista de CD18b" quando usado no presente pedido refere-se a uma molécula que se liga a CD18b (preferencialmente CD18 humano) e inibe ou reduz substancialmente uma atividade biológica de CD18. Normalmente, o antagonista irá bloquear (parcialmente ou completamente) a habilidade de uma célula (por exemplo, um neutrófilo) que expressa a subunidade CD18 em sua superfície celular para se ligar ao endotélio. Exemplos não limitantes de antagonistas de CD18 incluem anticorpos, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas bio-orgânicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos e seus metabólitos, sequências controle de transcrição e tradução, e similares. Em uma realização da invenção, o antagonista de CD18 é um anticorpo.

Exemplos de anticorpos anti-CD18 incluem MHM23 (Hildreth *et*

al., *Eur. J. Immunol.* 13:202-208 (1983)), M18/2(IgG_{2a}; Sanches-Madrid *et al.*, *J. Exp. Med.* 158:586-602 (1983)), H52 (Coleção Americana de Tipos de Cultura (ATCC) Depósito HB 10160), Mas191c e IOT18 (Vermot Desroches *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 33:277-286 (1991)), e NA-8 (documento WO 94/12214).

5 Em uma realização, o anticorpo é aquele que se liga ao epitopo de CD18 tanto com ligações a MHM23 como H52. Em uma realização da invenção, o anticorpo tem alta afinidade para o polipeptídeo CD18. Em certas realizações, o anticorpo pode se ligar a uma região no domínio extracelular de CD18 que se associa com CD11b e o anticorpo também pode se dissociar das cadeias A e P
10 (por exemplo, o anticorpo pode se dissociar do complexo CD11b e CD18, como é o caso do anticorpo MHM23).

Proteína quimiotóxica de monócito (MCP-1) é uma quimioquina envolvida na imunidade inata e resposta efetora de Th2, e diferenciação de célula T CD4+. Ver, por exemplo, Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, 5ª
15 Edição, Lippincott Williams & Wilkins, (Filadélfia, 2003) nas páginas 801-840.

O termo “antagonista de MCP-1” quando usado no presente pedido refere-se a uma molécula que se liga a MCP-1 e inibe ou reduz substancialmente uma atividade biológica de MCP-1. Exemplos não limitantes de antagonistas de MCP-1 incluem anticorpos, proteínas, peptídeos,
20 glicoproteínas, glicopeptídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos nucléicos, moléculas bio-orgânicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos e seus metabólitos, sequências controle de transcrição e tradução, e similares. Em uma realização da invenção, o antagonista de MCP-1 é um anticorpo, especialmente um anticorpo anti-MCP-1 que se liga a MCP-1 humana.

25 Proteínas alfa e beta inflamatórias de macrófagos (MIP-1 alfa e beta são conhecidas como quimioquinas) MIP-1 alfa está envolvida na imunidade inata e resposta efetora de Th1, e diferenciação de célula T CD4+. Ver, por exemplo, Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, 5ª Edição, Lippincott

Williams & Wilkins, (Filadélfia, 2003) nas páginas 801-840.

O termo “antagonista de MIP-1 alfa” quando usado no presente pedido refere-se a uma molécula que se liga a MIP-1 alfa e inibe ou reduz substancialmente uma atividade biológica de MIP-1 alfa. Exemplos não limitantes de antagonistas de MIP-1 alfa incluem anticorpos, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas bio-orgânicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos e seus metabólitos, sequências controle de transcrição e tradução, e similares. Em uma realização da invenção, o antagonista de MIP-1 alfa é um anticorpo, especialmente um anticorpo anti-MIP-1 alfa que se liga a MIP-1 alfa humana.

O termo “antagonista” quando usado no presente pedido refere-se a uma molécula capaz de neutralizar, bloquear, inibir, anular, reduzir ou interferir nas atividades de uma proteína da invenção, incluindo sua ligação a um ou mais receptores, no caso de um ligante, ou ligação a um ou mais ligantes, no caso de um receptor. Antagonistas incluem anticorpos e fragmentos de ligação de antígeno destes, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, polissacarídeos, oligossacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas bio-orgânicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos e seus metabólitos, sequências controle de transcrição e tradução, e similares. Antagonistas também incluem moléculas pequenas inibidoras de uma proteína da invenção, e proteínas de fusão, moléculas receptoras e derivadas que se ligam especificamente a uma proteína, através disso, sequestrando sua ligação ao seu alvo, antagonistas variantes da proteína, moléculas *antisense* dirigidas a uma proteína da invenção, aptâmeros de RNA e ribozimas contra uma proteína da invenção.

Um anticorpo “de bloqueio” ou um anticorpo “antagonista” é aquele que inibe ou reduz as atividades biológicas do antígeno ao qual se liga.

Certos anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas inibem substancialmente ou completamente a atividade biológica do antígeno.

“URCGPs” refere-se a proteínas que são supra-reguladas em células CD11b+Gr1+ de tumores resistentes ao anti-VEGF. URCGPs incluem, mas não se limitam a elastase de neutrófilo, CD14, expi, IL-13R, LDLR, TLR-1, RLF, Endo-Lip, SOCS13, FGF13, IL-4R, IL-11R, IL-1RII, IFN TM1, TNFRSF18, WNT5A, carreador secretório de membrana 1, HSP86, EGFR, EphRB2, GPCR25, HGF, Angiopietina Like-6, Eph-RA7, Semaforina VIb, Neurotrofina 5, Claudina-18, MDC15, ECM e ADAMTS7B. Em certas realizações, URCGPs refere-se a IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13 e/ou IL-4R.

“DRCGPs” refere-se a proteínas que são infra-reguladas em células CD11b+Gr1+ de tumores resistentes ao anti-VEGF. DRCGPs incluem, mas não se limitam a THBS1, Crea7, Aquaporina-1, proteína da família carreadora de solutos (SCF38), apolipoproteína E (APOE), proteína de ligação a ácido graxo (FABP), NCAM-140, Fibronectina tipo III, WIP, CD74, ICAM-2, Jagged1, Itga4, ITGB7, TGF-BII-R, TGFb IEP, Smad4, BMPR1A, CD83, Dectina-1, CD48, E-selectina, IL-15, Supressor de sinalização 4 de citocina, Cyt4 e CX3CR1. Em certas realizações, DRCGPs refere-se a THBS1 e/ou Crea7.

“URRTPs” refere-se a proteínas que são supra-reguladas em tumores resistentes ao anti-VEGF. URRTPs incluem, mas não se limitam a Notch2, DMD8, MCP-1, ITGB7, G-CSF, IL-8R, MIP2, MSCA, GM-CSF, IL-1R, Meg-SF, HSP1A, IL-1R, G-CSFR, IGF2, HSP9A, FGF18, ELM1, Ledgfa, receptores de limpeza tipo A, Macrófago lectina tipo C, Pigr3, Macrófago SRT-1, receptor de acoplamento à proteína G, ScyA7, IL-1R2, proteína de indução de IL-1, precursor de IL-1beta e precursor de ILIX. Em certas realizações, URRTPs refere-se a MSCA, MIP2, IL-8R e/ou G-CSF.

“DRRTPs” refere-se a proteínas que são infra-reguladas em

tumores resistentes ao anti-VEGF. URRTPs incluem, mas não se limitam a IL10-R2, Erb-2.1, Caveolina 3, Semcap3, INTG4, THBSP-4, ErbB3, JAM, Eng, JAM, Eng, JAM-2, Pecam1, Tlr3, TGF-B, FIZZ1, Wfs1, TP 14A, EMAP, SULF-2, Matriz extracelular e, CTFG, TFPI, XCP2, Ramp2, ROR-alfa, Ephrin B1, SPARC-Like 1 e Semaforina A. Em certas realizações, DR RTP refere-se a IL10-R2, THBSP-4 e/ou JAM-2.

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 ligadas alternativamente) e variantes alélicas do polipeptídeo de ocorrência natural.

Uma "cadeia polipeptídica" é um polipeptídeo em que cada um dos domínios deste está ligado a outro(s) domínio(s) por ponte(s) peptídicas, em oposição a interações não covalentes ou pontes bissulfeto.

Um polipeptídeo "variante" significa um polipeptídeo biologicamente ativo que tem pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácido com a sequência do polipeptídeo nativo correspondente ou fragmento deste. Tais variantes incluem, por exemplo, polipeptídeos em que um ou mais resíduos de aminoácidos (aminoácidos que ocorrem naturalmente ou aminoácidos que não ocorrem naturalmente) 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 a sequência do polipeptídeo nativo. Variantes também incluem fragmentos da sequência nativa de polipeptídeos (por exemplo, subsequências, truncamentos, etc.), tipicamente ativos biologicamente.

"Porcentagem (%) de identidade de sequência aminoácido" no presente pedido é definido como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos em uma sequência selecionada, após alinhamento das sequências e introdução de *gaps*, se necessário, para alcançar a porcentagem máxima de identidade de sequência, sem considerar qualquer substituição conservativa como parte da identidade de sequência. Alinhamento para os propósitos de determinação da porcentagem de identidade de sequência de aminoácido pode ser alcançado de várias maneiras que estão dentro da habilidade na técnica, por exemplo, usando-se programas de computador disponíveis publicamente, como os programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 ou Megalign (DNASTAR). Esses técnicos no assunto podem determinar parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar o máximo alinhamento sobre o comprimento total das sequências sendo comparadas. Para os propósitos no presente, no entanto, valores de % de identidade de sequência de aminoácido são obtidos conforme descrito abaixo, pelo uso do programa de computador de comparação de sequência ALIGN-2. O programa de computador de comparação de sequência ALIGN-2 foi desenvolvido pela Genentech, Inc. e foi depositado com documentação de usuário no Escritório de Direitos Autorais Americano, Washington, D.C., 20559, onde está registrado sob Registro de Direito Autoral Americano N° TXU510087, e está publicamente disponível pela Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia. O programa ALIGN-2 deve

ser compilado para uso em um sistema operacional UNIX, por exemplo, UNIX V4.0D digital. Todos os parâmetros de comparação de sequência são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Para os propósitos no presente, a % de identidade de sequência de aminoácido de uma dada sequência de aminoácido A, com ou em comparação a uma dada sequência de aminoácido B (que pode alternativamente ser formulada como uma dada sequência de aminoácido A que possui ou compreende certa % de identidade de sequência de aminoácido idêntica a ou em comparação a uma dada sequência de aminoácido B) é calculada como a seguir:

100 vezes a fração X/Y

onde X é o número de resíduos de aminoácido conseguidos como partidas idênticas pelo programa de alinhamento de sequência ALIGN-2 nesse alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácidos em B. Estima-se que onde o comprimento da sequência de aminoácido A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácido B, a % da identidade de sequência de aminoácido de A para B não seja igual a % da identidade de sequência de aminoácido B para A.

O termo "proteína variante" como usado no presente pedido refere-se a uma variante como descrito acima e/ou uma proteína que inclui uma ou mais mutações de aminoácido na sequência da proteína nativa. Opcionalmente, uma ou mais mutações de aminoácido incluem substituição (ões) de aminoácido. Proteínas e variantes destas para uso na invenção podem ser preparadas por uma variedade de métodos bem conhecidos na técnica. Sequências de aminoácido variantes de uma proteína podem ser preparadas por mutações no DNA da proteína. Tais modificações incluem, por exemplo, deleções, inserções e/ou substituições de resíduos nas sequências de aminoácido da proteína. Qualquer combinação de deleção, inserção e

substituição pode ser feita para se chegar à construção final tendo a atividade desejada. As mutações que serão feitas no DNA que codifica a variante não devem colocar a sequência fora do quadro de leitura e, preferivelmente, não criarão regiões complementares que poderiam produzir estrutura de mRNA secundária. Patente EP 75.444A.

As proteínas variantes, opcionalmente, são preparadas por mutagênese de nucleotídeos sítio-dirigida no DNA que codifica a proteína nativa ou por técnicas de exibição por fago, produzindo assim o DNA que codifica a variante e, posteriormente, expressando o DNA na cultura celular recombinante.

Enquanto o sítio para a introdução da variação de sequência de aminoácido é pré-determinado, a mutação por si mesma não precisa ser pré-determinada. Por exemplo, para otimizar o desempenho de uma mutação em um dado sítio, mutagênese aleatória pode ser conduzida no códon ou região alvo e as proteínas variantes expressas são selecionadas para a melhor combinação para a atividade desejada. Técnicas para produzir mutações de substituição em sítios pré-determinados no DNA tendo uma sequência conhecida são bem conhecidas, como, por exemplo, mutagêneses específicas ao sítio. A preparação das proteínas variantes, descrita no presente pedido, pode ser alcançada por técnicas de exibição por fago, como aquelas descritas na publicação WO 00/63380.

Após tal clone ser selecionado, a região da proteína mutante pode ser removida e colocada em um vetor apropriado para produção de proteína, geralmente um vetor de expressão do tipo que pode ser empregado para transformação de um hospedeiro apropriado.

Deleções de sequência de aminoácido geralmente variam em cerca de 1 a 30 resíduos, opcionalmente 1 a 10 resíduos, opcionalmente 1 a 5 resíduos ou menos, e tipicamente estão próximos.

Inserções de sequência de aminoácidos incluem fusões nas terminações amino e/ou carboxila de um resíduo a polipeptídeos de comprimento essencialmente irrestrito, bem como inserções dentro da sequência de resíduos de aminoácido único ou múltiplo. Inserções dentro da
 5 sequência (isto é, inserções dentro da sequência da proteína nativa) podem variar, geralmente, de cerca de 1 a 10 resíduos, opcionalmente 1 a 5, ou opcionalmente 1 a 3. Um exemplo de uma inserção terminal inclui uma fusão de uma sequência sinal, heteróloga ou homóloga à célula hospedeira no N-terminal, para facilitar a secreção a partir dos hospedeiros recombinantes.

10 Proteínas variantes adicionais são aquelas em que pelo menos um resíduo de aminoácido na proteína nativa foi removido e um resíduo diferente foi inserido em seu lugar. Tais substituições podem ser feitas de acordo com aquelas mostradas na Tabela 1. Proteínas variantes também podem compreender aminoácidos não naturais, conforme descrito no presente pedido.

15 Aminoácidos podem ser agrupados de acordo com similaridades nas propriedades de suas cadeias laterais (em A. L. Lehninger, em *Biochemistry*, segunda edição, páginas 73-75, Worth Publishers, Nova York (1975)):

(1) não polar: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W),

20 Met (M)

(2) polar não carregada: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácida: Asp (D), Glu (E)

(4) básica: Lys (K), Arg (R), His(H)

25 Alternativamente, resíduos que ocorrem naturalmente podem ser divididos em grupos, com base nas propriedades comuns das cadeias laterais:

(1) hidrofóbica: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrofílica neutra: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácida: Asp, Glu;

(4) básica: His, Lys, Arg;

(5) resíduos que influenciam na orientação da cadeia: Gly, Pro;

(6) aromática: Trp, Tyr, Phe.

5

TABELA 1

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu

“Resíduos de aminoácido de ocorrência natural” (isto é, resíduos de aminoácidos codificados pelo código genético) podem ser selecionados do grupo que consiste de: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutâmico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptofano (Trp); tirosina (Tyr) e valina (Val). Um “resíduo de aminoácido que não ocorre naturalmente” refere-se a um resíduo diferente daqueles resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente listados acima, que são capazes de se ligar covalentemente a resíduo(s) de aminoácido(s) adjacente(s) em uma cadeia polipeptídica. Exemplos de resíduos de aminoácidos que não ocorre naturalmente incluem, por exemplo, norleucina, ornitina, norvalina, homoserina e outros resíduos de aminoácidos análogos, como aqueles descritos em Ellman *et al. Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991) e publicações de pedido de patente US 20030108885 e 20030082575. Resumidamente, estes procedimentos envolvem ativação de um supressor de tRNA com um resíduo de aminoácido que não ocorre naturalmente seguido por transcrição e tradução do RNA, *in vitro* ou *in vivo*. Ver, por exemplo, publicações de pedido de patente US 20030108885 e 20030082575; Noren *et al. Science* 244:182 (1989) e Ellman *et al.*, acima.

Um polipeptídeo “isolado” é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado 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, e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em certas realizações, o polipeptídeo será purificado (1) para mais que 95% por peso de anticorpo, como determinado pelo método Lowry, ou mais que 99% por peso, (2) para um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de N-terminal ou

sequência de aminoácido interna, pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução, usando-se *Coomassie blue* ou *silver stain*. O polipeptídeo isolado inclui o polipeptídeo *in situ* dentro de células recombina-
 5 recombina-tes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo não esteja presente. Geralmente, no entanto, o polipeptídeo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

O termo "anticorpo" é usado no senso mais amplo e especificamente abrange anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos um anticorpo intacto, e fragmentos de anticorpos (ver abaixo), contanto que eles exibam a atividade biológica desejada.

A menos que indicado de outra forma, a expressão "anticorpo multivalente" é usada ao longo desta especificação para denotar um anticorpo que compreende três ou mais sítios de ligação de antígeno. O anticorpo multivalente é tipicamente modificado geneticamente para conter três ou mais sítios de ligação de antígeno e, geralmente, não é um anticorpo IgM ou IgA de
 20 sequência nativa.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem somente uma porção de um anticorpo intacto, geralmente incluindo um sítio de ligação de antígeno do anticorpo intacto e, dessa forma, mantendo a habilidade de ligação ao antígeno. Exemplos de fragmentos de anticorpos englobados pela presente
 25 definição incluem: (i) o fragmento Fab, tendo domínios VL, CL, VH e CH1; (ii) o fragmento Fab', que é um fragmento Fab que possui um ou mais resíduos cisteína no C-terminal do domínio CH1; (iii) o fragmento Fd que possui domínios VH e CH1; (iv) o fragmento Fd' que possui domínios VH e CH1 e um

ou mais resíduos cisteína no C-terminal do domínio CH1; (v) o fragmento Fv que possui os domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo; (vi) o fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)) que consiste de um domínio VH; (vii) regiões CDR isoladas; (viii) fragmentos F(ab')₂, um fragmento bivalente que inclui dois fragmentos Fab' ligados por uma ponte bissulfeto na região de dobradiça; (ix) moléculas de anticorpo de cadeia única (por exemplo, cadeia única Fv; scFv) (Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988); e Huston *et al.*, *PNAS (USA)* 85:5879-5883 (1988)); (x) "diacorpos" com dois sítios de ligação de antígeno, que compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH) conectados a um domínio variável da cadeia leve (VL) na mesma cadeia do polipeptídeo (ver, por exemplo, patente EP 404,097; documento WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); (xi) "anticorpos lineares" que compreendem um par de segmentos acoplados (VH-CH1-VH-CH1) que, junto com polipeptídeos da cadeia leve complementares, formam um par de regiões de ligação de antígeno (Zapata *et al.* *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995); e patente US 5.641.870).

O termo "anticorpo monoclonal" como usado no presente 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 por possíveis mutações, por exemplo, mutações que ocorrem naturalmente, que podem estar presentes em menores quantidades. Dessa forma, o modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo uma mistura de anticorpos distintos. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único antígeno. Em certas realizações, um anticorpo monoclonal tipicamente inclui um anticorpo que compreende uma sequência de polipeptídeo que se liga a um alvo, em que a sequência de polipeptídeo de ligação alvo foi obtida por um processo que inclui a seleção de uma única sequência de polipeptídeo de ligação alvo, a partir de

uma pluralidade de sequências de polipeptídeos. Por exemplo, o processo de seleção pode ser a seleção de um único clone, a partir de uma pluralidade de clones, como um *pool* de clones de hibridoma, clones de fago ou clones de DNA recombinante. Deve-se entender que a sequência de ligação alvo selecionada também pode ser alterada, por exemplo, para melhorar a afinidade para este alvo, humanizar a sequência de ligação alvo, melhorar sua produção na cultura celular, reduzir sua imunogenicidade *in vivo*, criar um anticorpo multiespecífico, etc., e que um anticorpo que compreende a sequência de ligação alvo alterada é também um anticorpo monoclonal desta invenção. Ao contrário a preparações de anticorpo policlonal que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. Além disso, para suas especificidades, preparações de anticorpos monoclonais são vantajosas, pois elas estão tipicamente descontaminadas de outras imunoglobulinas.

O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, e não sendo construído como produção requerida do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para serem usados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos por diversas técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (por exemplo, Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, *Hybridoma*, 14(3): 253 -260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, em: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de DNA recombinante (ver, por exemplo, Patente US 4.816.567), tecnologias de exibição por fago (ver, por exemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.*

338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); e Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), e tecnologias para produção de anticorpos humanos ou similares aos humanos em animais que têm todo ou partes dos loci de imunoglobulina humana ou genes que codificam sequências de imunoglobulinas humanas (ver, por exemplo, documento WO 1998/24893, documento WO 1996/34096, documento WO 1996/33735, documento WO 1991/10741, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); patentes US 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 e 5.661.016, Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992), Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Os anticorpos monoclonais no presente pedido especificamente incluem anticorpos "quiméricos" em que uma porção das cadeias pesadas e/ou leve é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes nos anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencente a uma classe ou subclasse específica de anticorpo, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes nos anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes à outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde 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 alguns exemplos, resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos correspondentes não humanos. Além disto, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para, além disso, refinar 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 àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs 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, ver 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). Ver também, por exemplo, Vaswani e Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle e Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) e patentes US 6.982.321 e 7.087.409. Ver também van Dijk e van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Anticorpos humanos podem ser preparados pela administração do antígeno a um animal transgênico que foi modificado para produzir tais anticorpos em resposta ao desafio com antígeno, mas cujos *loci* endógenos foram inabilitados, por exemplo, xeno-camundongo imunizado (ver, por exemplo, patentes US 6.075.181 e 6.150.584 relativas à tecnologia

XENOMOUSE™). Ver também, por exemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103:3557-3562 (2006) relacionado a anticorpos humanos gerados por tecnologia de hibridoma de célula B humana.

Um “anticorpo humano” é aquele que possui uma sequência
 5 de aminoácido 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
 10 não humanos. Anticorpos humanos podem ser produzidos usando-se 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.* *PNAS (USA)* 95:6157-6162 (1998));
 15 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 de endógenos de imunoglobulina foram parcialmente ou completamente inativados. Sob desafio, observa-se
 20 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.*,
 25 *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 linfócito B humano que produz um anticorpo dirigido contra um antígeno alvo (tais linfócitos B podem ser recuperados de um indivíduo ou podem ser imunizados *in vitro*). Ver, por exemplo, Cole *et al.*,
5 *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.

O termo “variável” refere-se ao fato de que certas porções do domínio variável diferenciam-se extensivamente na sequência entre anticorpos e são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo
10 específico ao seu antígeno específico. No entanto, a variabilidade não é distribuída uniformemente por todos os domínios variáveis dos anticorpos. Ela está concentrada em três segmentos chamados regiões hipervariáveis, ambos nos domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas
15 de regiões de estrutura (FRs). Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas nativas compreendem quatro FRs, adotando amplamente uma configuração folha dobrada beta, conectada por três regiões hipervariáveis, as quais formam alças que se conectam, e em alguns casos formando parte da estrutura folha dobrada beta. As regiões hipervariáveis em cada
20 cadeia são mantidas juntas em íntima proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno dos anticorpos. (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os domínios constantes não
25 estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, como participação do anticorpo na citotoxicidade celular dependente de anticorpo.

O termo “região hipervariável”, “HVR” ou “HV”, quando usado

no presente pedido refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação de antígeno. Por exemplo, o termo região hipervariável refere-se às regiões de um domínio variável do anticorpo que são hipervariáveis na sequência e/ou formas estruturalmente definidas como alças. Geralmente, anticorpos compreendem seis regiões HVRs, três na VH (H1, H2, H3) e três na VL (L1, L2, L3). Em anticorpos nativos, H3 e L3 exibem a maior diversidade das seis HVRs, e acredita-se que H3, em particular, desempenhe um papel exclusivo em conferir fina especificidade a anticorpos. Ver, por exemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson e Wu, em *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). Realmente, anticorpos de camelídeos que consistem de uma cadeia pesada, somente são funcionais e estáveis na ausência da cadeia leve. Ver Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Diversos delineamentos de HVR estão em uso e estão incluídos no presente pedido. As Regiões Determinadas por Complementaridade (CDRs) são baseadas na variabilidade de sequência e são mais comumente utilizadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, ao contrário, refere-se à localização das alças estruturais (Chothia e Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). As regiões hipervariáveis AbM HVRs representam um acordo entre as HVRs de Kabat e alças estruturais de Chothia, e são usadas pelo programa de modelação de anticorpo AbM da Oxford Molecular. As HVRs “contato” estão baseadas em uma análise das estruturas cristalinas complexas disponíveis. Os resíduos de cada uma destas HVRs estão apontados abaixo.

	<u>Alça</u>	<u>Kabat</u>	<u>AbM</u>	<u>Chothia</u>	<u>Contato</u>
	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
5	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Numeração de Kabat)
	H1	H31-H35	H26-H3	H26-H32	H30-H35 (Numeração de Chothia)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVRs podem compreender “regiões hipervariáveis estendidas”, como a seguir: 24-36 or 24-34 (L1), 46-56 ou 50-56 (L2) e 89-97 or 89-96 (L3) na VL e 26-35 (H1), 50-65 ou 49-65 (H2) e 93-102, 94-102, ou 95-102 (H3) na VH. Os resíduos do domínio variável são numerados de acordo com Kabat *et al.*, acima, para cada uma destas definições.

Resíduos de “região de estrutura” ou “FR” são aqueles resíduos do domínio variável, exceto os resíduos da região hipervariável, como definido no presente pedido.

Os termos “numeração do resíduo do domínio variável como em kabat” ou “numeração da posição do aminoácido como em Kabat”, e variações destes, referem-se ao sistema de numeração usado para domínios variáveis da cadeia pesada ou domínios variáveis da cadeia leve da coleção de anticorpos em kabat *et. al.*, acima. Usando-se este sistema de numeração, a sequência de aminoácido linear atual pode conter menos ou mais aminoácidos correspondendo a um encurtamento ou inserção em uma FR ou HVR do domínio variável. Por exemplo, um domínio variável da cadeia pesada pode incluir uma única inserção de aminoácido (resíduo 52a, de acordo com Kabat) após resíduo 52 da H2 e resíduos inseridos (por exemplo, resíduos 82a, 82b e 82c, etc., de acordo com Kabat) após resíduo 82 da FR da cadeia pesada. A

numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada por um dado anticorpo pelo alinhamento das regiões de homologia da sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat “padrão”.

Ao longo da presente especificação e das reivindicações, o sistema de numeração de Kabat é geralmente utilizado quando relativo a um resíduo no domínio variável (cerca de, resíduos 1-107 da cadeia leve e resíduos 1-113 da cadeia pesada) (por exemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). O “sistema de numeração EU” ou “índice EU” é geralmente usado quando relativo a um resíduo em uma região contante da cadeia pesada da imunoglobulina (por exemplo, o índice EU relatado em Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, EU. (1991), expressamente incorporado ao presente como referência). A menos que estabelecido de outra forma no presente pedido, referências aos resíduos no domínio variável dos anticorpos significam numeração de resíduo pelo sistema de numeração de Kabat. A menos que estabelecido de outra forma no presente pedido, referências aos números de resíduos no domínio variável dos anticorpos significam numeração de resíduo pelo sistema de numeração EU (por exemplo, ver Pedido Provisório US 60/640,323, Figuras para numeração EU).

Dependendo da sequência de aminoácidos dos domínios constantes de suas cadeias pesadas, os anticorpos (imunoglobulinas) podem ser designados para diferentes “classes”. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e várias destas podem, ainda, ser divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG₁ (incluindo alótipos não A e A), IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamados de α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente. As subunidades de estrutura e configurações

tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas e descritas em geral, por exemplo, em Abbas *et al. Cellular and Mol. Immunology*, 4ª edição (W.B. Saunders, Co., 2000). Um anticorpo pode ser parte de uma molécula de fusão maior, formada pela associação covalente ou não covalente do anticorpo com uma ou mais proteínas ou peptídeos.

As “cadeias leves” dos anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser designadas para um ou dois tipos claramente distintos, chamados kappa (κ) e lambda (λ), baseados na sequência de aminoácidos de seus domínios constantes.

O termo “região Fc” é usado para definir a região C-terminal de uma cadeia pesada da imunoglobulina, que pode ser gerada pela digestão por papaína de um anticorpo intacto. A região Fc pode ser uma região Fc de sequência nativa ou uma região Fc variante. No entanto os limites da região Fc de uma cadeia pesada da imunoglobulina podem variar, a região Fc da cadeia pesada de IgG humana é usualmente definida para alcançar desde um resíduo de aminoácido cerca de na posição Cys226 ou cerca de na posição Pro230, até a terminação carboxila da região Fc. A lisina C-terminal (resíduo 447, de acordo com o sistema de numeração EU) da região Fc pode ser removida, por exemplo, durante a purificação do anticorpo ou pela recombinação do ácido nucléico modificado geneticamente, que codifica uma cadeia pesada do anticorpo. Consequentemente, uma composição de anticorpos intactos pode compreender populações de anticorpo com todos os resíduos K447 removidos, populações de anticorpo sem resíduos K447 removidos, e populações de anticorpo que possuem uma mistura de anticorpos com e sem resíduos K447. A região Fc de uma imunoglobulina geralmente compreende dois domínios constantes, um domínio CH2 e um domínio CH3, e opcionalmente compreende um domínio CH4.

A menos que indicado de outra forma no presente pedido, a

numeração dos resíduos em uma cadeia pesada da imunoglobulina é aquela do índice EU, como em Kabat *et al.*, acima. O “índice EU como em Kabat” refere-se à numeração de resíduos do anticorpo IgG1 EU humano.

Por “cadeia da região Fc” no presente pedido entende-se uma das
5 duas cadeias polipeptídicas de uma região Fc.

O “domínio CH2” de uma região Fc da IgG humana (também chamado de domínio “Cg2”), usualmente estende-se de um resíduo de aminoácido cerca de na posição 231 até um resíduo de aminoácido cerca de na posição 340. O domínio CH2 é o único que não é intimamente pareado com
10 um outro domínio. De preferência, duas cadeias de carboidrato ramificadas N-ligadas são interpostas entre os dois domínios CH2 de uma molécula IgG nativa intacta. Foi especulado que o carboidrato pode fornecer um substituto para o pareamento domínio-domínio e ajudar a estabilizar o domínio CH2. Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985). O domínio CH2 no presente
15 pedido pode ser um domínio CH2 de sequência nativa ou domínio CH2 variante.

O “domínio CH3” compreende a distância dos resíduos C-terminal até um domínio CH2 em uma região Fc (isto é, cerca de do resíduo de aminoácido 341 até cerca de o resíduo de aminoácido 447 de uma IgG). A
20 região CH3 pode ser um domínio CH3 de sequência nativa ou um domínio CH3 variante (por exemplo, um domínio CH3 com uma “protuberância” em uma cadeia deste e uma “cavidade” correspondente introduzida em outra cadeia deste; ver patente US 5.821.333, expressamente incorporada ao presente como referência). Tais domínios CH3 variantes podem ser usados para
25 fabricar anticorpos multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos), como descrito no presente pedido.

“Região de dobradiça” é geralmente definida como uma distância de cerca de Glu216, ou cerca de Cys226, até cerca de Pro230 da IgG1

humana (Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985)). Regiões de dobradiça de outros isotipos IgG podem ser alinhadas com a sequência IgG1 pela colocação do primeiro e último resíduos de cisteína, formando ligação S-S entre cadeias pesadas nas mesmas posições. A região de dobradiça no presente pedido pode ser uma região de dobradiça de sequência nativa ou uma região de dobradiça variante. A duas cadeias polipeptídicas de uma região de dobradiça variante geralmente mantêm pelo menos um resíduo de cisteína por cadeia polipeptídica, de forma que as duas cadeias polipeptídicas da região de dobradiça variante possam formar um ponte bissulfeto entre as duas cadeias. A região de dobradiça no presente pedido pode ser uma região de dobradiça de sequência nativa humana ou uma região de dobradiça de IgG1 humana nativa.

A “região Fc funcional” possui pelo menos uma “função efetora” de uma região Fc de sequência nativa. “Funções efetoras” exemplares incluem ligação C1q, citotoxicidade dependente de complemento (CDC), ligação de receptor Fc, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose, infra-regulação de receptores de superfície celular (por exemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Tais funções efetoras geralmente exigem que a região Fc seja combinada com um domínio de ligação (por exemplo, um domínio variável do anticorpo) e podem ser avaliadas usando-se vários testes conhecidos na técnica, para avaliação de tais funções efetoras de anticorpo.

Uma “região Fc de sequência nativa” compreende uma sequência de aminoácido idêntica a uma sequência de aminoácido de uma região Fc encontrada na natureza. Regiões Fc humanas de sequência incluem uma região Fc de IgG1 humana de sequência nativa (alótipes A e não A), região Fc de IgG2 humana de sequência nativa, região Fc de IgG3 humana de sequência nativa, região Fc de IgG4 humana de sequência nativa, bem como variantes

desatas acima, que ocorrem naturalmente.

Uma “região Fc variante” compreende uma sequência de aminoácido que difere daquela região Fc de sequência nativa em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. Em certas realizações, a região Fc variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido, comparada a uma região Fc de sequência nativa ou à região Fc de um polipeptídeo parental, por exemplo, com cerca de uma a cerca de dez substituições de aminoácidos, e preferencialmente de cerca de uma a cerca de cinco substituições de aminoácidos em uma região Fc de sequência nativa ou na região Fc do polipeptídeo parental. A região Fc variante no presente pedido, tipicamente irá possuir, por exemplo, cerca de 80% de identidade de sequência com uma região Fc de sequência nativa e/ou com uma região Fc de um polipeptídeo parental, ou pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência com esta, ou pelo menos cerca de 95% ou mais de identidade de sequência com esta.

“Funções efetoras” do anticorpo referem-se àquelas atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou uma região Fc de sequência de aminoácido variante) de um anticorpo, e variam com o isotipo do anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpo incluem: ligação C1q e citotoxicidade dependente de complemento (CDC), ligação do receptor Fc, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose, infra-regulação de receptores de superfície celular (por exemplo, receptor de célula B) e ativação de célula B.

“Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo” ou “ADCC” refere-se a uma forma de citotoxicidade na qual Ig secretada ligado aos receptores Fc (FcRs), presentes em certas células citotóxicas (por exemplo, células *natural killer* (NK), neutrófilos e macrófagos), permitem que estas células efetoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo que produz antígeno e subsequentemente destroem a célula alvo com

citotoxinas. As células primárias para mediação de ADCC, células NK, expressam somente FcγRIII, enquanto que monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão FcR em células hematopoiéticas está resumida na Tabela 3 na página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para avaliar atividade ADCC de uma molécula de interesse, um teste ADCC *in vitro*, como descrito na patente US 5.500.362 ou 5.821.337, pode ser realizado. Células efetoras úteis para tais testes incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células *Natural Killer* (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, atividade ADCC da molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, em um modelo animal, como divulgado em Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e desempenham funções efetoras. Em certas realizações, as células expressam pelo menos FcγRIII e desempenham função efetora ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células *natural killer* (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos, com PBMCs e células NK sendo geralmente preferidas. As células efetoras podem ser isoladas de uma fonte nativa destas, por exemplo, do sangue ou PBMCs, como descrito no presente pedido.

"Receptor Fc" ou "FcR" descrevem um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. Em algumas realizações, um FcR é um FcR humano nativo. Em algumas realizações, um FcR é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui subclasses dos receptores FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas ligadas destes receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que têm sequências similares de aminoácidos que diferem primeiramente nos domínios citoplasmáticos

destes. Receptor de ativação Fc γ RIIA contém um motivo de ativação de imuno-receptor baseado em tirosina (ITAM) em seu domínio citoplasmático. Receptor de inibição Fc γ RIIB contém um motivo de inibição de imuno-receptor baseado em tirosina (ITIM) em seu domínio citoplasmático. (ver, por exemplo, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs foram revisados, por exemplo, em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); e de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" no presente pedido.

Os termos "receptor Fc" ou "FcR" também incluem o receptor neonatal, FcRn, que é responsável por transferir as IgGs maternas para os fetos (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) e Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) e regula homeostase de imunoglobulinas. Métodos para medir ligação ao FcRn são conhecidos (ver, por exemplo, Ghetie e Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

Ligação a FcRn humano *in vivo* e meia-vida do soro de polipeptídeos de ligação de alta afinidade a FcRn humano podem ser testados, por exemplo, em camundongos transgênicos ou linhagens de células humanas transfectadas que expressam FcRn humano, ou em primatas, nos quais os polipeptídeos com uma região Fc variante são administrados. O documento WO 2000/42072 (Presta) descreve anticorpos variantes com ligação aos FcRs melhoradas ou diminuídas. Ver também, por exemplo, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" refere-se à lise de uma célula alvo na presença de complemento. A ativação da via de complemento tradicional é iniciada pela ligação do primeiro componente do

sistema de complemento (C1q) aos anticorpos (da subclasse apropriada), que são ligados aos seus antígenos cognatos. Para avaliar ativação de complemento, um teste CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), pode ser realizado.

5 Polipeptídeos variantes com sequências de aminoácido da região Fc alteradas (polipeptídeos com uma região Fc variante) e capacidade de ligação C1q aumentada ou diminuída estão descritos na patente US 6.194.551.551 B1 e no documento WO 1999/511642. Ver também, por exemplo, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

10 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, comparado com um anticorpo parental que não possui aquela(s) alteração(ões). Em uma realização, um anticorpo de afinidade madura preferido possui afinidade nanomolar ou até
15 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) descrevem maturação da afinidade por mistura de domínio VH e VL. Mutagênese aleatória de CDR e/ou resíduos de estrutura é descrita por: Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*
20 *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 “ligante flexível” no presente pedido refere-se a um peptídeo que compreende dois ou mais resíduos de aminoácidos ligados por ligações
25 peptídicas e fornece mais liberdade de rotação para dois polipeptídeos (como duas regiões Fd) ligadas através deste. Tal liberdade de rotação permite que dois ou mais sítios de ligação de antígeno ligados pelo ligante flexível acessem o(s) antígeno(s) mais eficientemente. Exemplos de sequências peptídicas de

ligantes flexíveis incluem gly-ser, gly-ser-gly-ser, ala-ser e gly-gly-gly-ser.

Um “domínio de dimerização” é formado pela associação de pelo menos dois resíduos de aminoácidos (geralmente resíduos de cisteína) ou de pelo menos dois peptídeos ou polipeptídeos (que podem ter as mesmas
 5 sequências ou diferentes sequências de aminoácidos). Os peptídeos ou polipeptídeos podem interagir entre si através de associação(ões) covalente(s) ou não covalente(s). Exemplos de domínios de dimerização no presente pedido incluem uma região Fc, uma região de dobradiça, um domínio CH3, um domínio CH4, um par CH1-CL, uma “interface” modificada geneticamente com
 10 um “botão” e/ou “protuberância”, como descrito na patente US 5.821.333, expressamente incorporada ao presente como referência, um zíper de leucina (por exemplo, um zíper de leucina jun/fos, ver Kostelney *et al.*, *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992); ou um zíper de leucina de levedura GCN4, um zíper de isoleucina, um par de dímeros receptores (por exemplo, receptor interleucina-8
 15 (IL-8R) e heterodímeros de integrina, como LFA-1 e GPIIb/IIIa), ou a(s) região(ões) de dimerização destes; polipeptídeos ligantes diméricos (por exemplo, fator de crescimento do nervo (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), membros VEGF-C, VEGF-D, PDG, e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); ver
 20 Arakawa *et al. J. Biol. Chem.* 269(45): 27833-27839 (1994) e Radziejewski *et al. Biochem.* 32(48): 1350 (1993)), ou a(s) região (ões) de dimerização deste, um par de resíduos de cisteína capazes de formar uma ponte bissulfeto, um par de peptídeos ou polipeptídeos, cada um destes compreendendo pelo menos um resíduo de cisteína (por exemplo, de cerca de um, dois ou três a
 25 cerca de dez resíduos de cisteína), de forma que tais pontes bissulfeto possam ser formadas entre os peptídeos ou polipeptídeos (deste ponto em diante no presente pedido “uma dobradiça sintética) e domínios variáveis do anticorpo. O domínio de dimerização preferido no presente pedido é uma região Fc ou uma

região de dobradiça.

Um "sítio de ligação de antígeno funcional" de um anticorpo é aquele que é 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 habilidade 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 ao antígeno, 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. 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, que diferencia este anticorpo dos outros anticorpos que se ligam ao mesmo antígeno.

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

Administração "em combinação com" um ou mais agentes terapêuticos adicionais inclui administração simultânea (concorrente) e/ou

consecutiva, em qualquer ordem.

"Mamífero" para os propósitos de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, animais domésticos e de fazenda, de zoológico, para esportes, ou animais de estimação, como cachorros, cavalos, gatos, gado, ovelhas, porcos, etc. Tipicamente, o mamífero é humano.

Uma "disfunção" é qualquer condição que se beneficiaria do tratamento com um anticorpo da invenção. Isto inclui disfunções ou doenças crônicas e agudas, incluindo aquelas condições patológicas que predispõe o mamífero para a disfunção em questão. Exemplos não limitantes de disfunções a serem tratadas no presente pedido incluem qualquer forma de tumor, tumores benignos e malignos; tumores vascularizados; hipertrofia; leucemia e malignidades linfoides; neuronais, gliais, astrocíticas, hipotalâmicas e outras, glandulares, de macrofágo, epiteliais, estromais e disfunções blastocélicas; disfunções inflamatórias, angiogênicas e imunológicas, disfunções vasculares resultantes da vascularização imprópria, anormal, excessiva, patológica e/ou permeabilidade vascular.

O termo "quantidade efetiva" ou "quantidade terapeuticamente efetiva" refere-se a uma quantidade de uma droga efetiva para tratar uma doença ou disfunção em um mamífero. No caso de câncer, a quantidade efetiva da droga pode reduzir o número de células cancerosas, reduzir o tamanho do tumor, inibir (isto é, diminuir até certo ponto e tipicamente interromper) a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos, inibir (isto é, diminuir até certo ponto e tipicamente interromper) metástases de tumor, inibir, até certo ponto, o crescimento do tumor, permitir o tratamento do tumor resistente e/ou aliviar, até certo ponto, um ou mais dos sintomas associados com a disfunção. 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.

5 “Tratamento” refere-se a ambos os tratamentos, terapêutico e profilático, ou medidas preventivas. Aqueles com necessidade de tratamento incluem aqueles já com a doença, bem como aqueles em que a doença será prevenida. Em certas realizações da invenção, tratamento pode se referir a uma supressão da angiogênese e/ou crescimento do tumor, ou atraso do início
10 da resistência ao anti-VEGF.

Os termos “atividade biológica” e “ativo biologicamente” com relação a um polipeptídeo da invenção referem-se à habilidade de uma molécula em se ligar especificamente e regular respostas celulares, por exemplo, proliferação, migração, etc. Respostas celulares também incluem
15 aquelas mediadas através de um receptor, incluindo, mas não se limitando a migração e/ou proliferação. Neste contexto, o termo “modulado” inclui tanto promoção como inibição.

Os termos “câncer” e “canceroso” referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada pela
20 desregulação do crescimento celular. Exemplos de câncer incluem, mas não se limitam a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais específicos de tais cânceres incluem câncer renal, câncer de mama, câncer de cólon, câncer retal, câncer colorretal, câncer de pulmão incluindo câncer de pulmão de célula pequena, câncer de
25 pulmão de célula não pequena, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células escamosas epiteliais), câncer cervical, câncer ovariano, câncer de próstata, câncer de fígado, câncer de bexiga, câncer do peritônio, câncer

hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago, incluindo câncer gastrointestinal, tumores estromais gastrointestinais (GIST), câncer pancreático, câncer de cabeça e pescoço, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, tecomas, arrenoblastomas, hepatoma, malignidades

5 hematológicas, incluindo linfoma não-Hodgkin (NHL), mieloma múltiplo e malignidades hematológicas agudas, carcinoma de endométrio ou uterino, endometriose, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de glândula salivar, câncer de vulva, câncer de tireóide, carcinomas esofágicos, carcinoma

10 hepático, carcinoma anal, carcinoma do pênis, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma laringeal, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoma de pele, Schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogênico, leiomyosarcomas, carcinomas do trato urinário, carcinomas da

15 tireóide, tumor de Wilm, bem como linfoma de célula B (incluindo linfoma não-Hodgkin (NHL) de baixo grau ou folicular), NHL de grau intermediário ou folicular, NHL imunoblástico de alto grau, NHL linfoblástico de alto grau, NHL de célula pequena não clivada de alto grau, doença de NHL grande, linfoma de células do manto, linfoma relacionado à AIDS e macroglobulinemia de

20 Waldenström, leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia de célula cabeluda, leucemia mieloblástica crônica e disfunção linfoproliferativa pós transplante (PTLD), bem como proliferação vascular anormal associada à facomatose, edema (como aqueles associados a tumores do cérebro) e síndrome de Meigs. "Tumor", como usado no presente pedido, refere-se a todo crescimento e proliferação celular neoplásica, maligno ou

benigno, e a todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos.

25 O termo "tumor resistente" refere-se a câncer, células cancerosas ou a um tumor que não responde completamente, perde ou mostra uma resposta reduzida ao longo da terapia contra o câncer, para uma terapia contra o câncer que compreende pelo menos um antagonista do VEGF. Um tumor

resistente também se refere a um tumor diagnosticado como resistente no presente pedido (também denominado no presente pedido como "tumor resistente ao anti-VEGF"). Em certas realizações, existe um aumento nas células CD11b+Gr1+ em um tumor resistente, comparado a um tumor que é sensível à terapia que inclui pelo menos um antagonista do VEGF.

O termo "composição anti-neoplásica" refere-se a uma composição útil no tratamento de câncer que compreende pelo menos um agente terapêutico ativo, por exemplo, "agente anti-câncer". Exemplos de agentes terapêuticos (agentes anti-câncer) incluem, mas não se limitam a, por exemplo, agentes quimioterápicos, agentes inibidores do crescimento, agentes citotóxicos, agentes usados na radioterapia, agentes anti-angiogênese, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina, toxinas e outros agentes para tratar o câncer, por exemplo, anticorpo anti-VEGF, antagonista do VEGF, anti-HER-2, anti-CD20, antagonistas do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (por exemplo, um inibidor tirosina quinase), inibidor HER1/EGFR, erlotinib, um inibidor COX-2 (por exemplo, celecoxib), interferons, citocinas, antagonistas (por exemplo, que neutralizam anticorpos) que se ligam a um ou mais dos receptores ErbB2, ErbB3, ErbB4 ou VEGF, inibidores para o receptor tirosina quinase para o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e/ou fator de célula-tronco (SCF) (por exemplo, mesilato de imatinib (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2 e outros agentes químicos orgânicos e bioativos, etc. Combinações destes também estão incluídas na invenção.

O termo "agente citotóxico" como usado no presente 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, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos e toxinas, como toxinas de molécula pequena ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana,

fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes destas.

Um "agente inibitório de crescimento" quando usado no presente pedido refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula, tanto *in vitro* como *in vivo*. Dessa forma, o agente inibitório de crescimento pode ser aquele que reduz significativamente a porcentagem de células na fase S. Exemplos de agentes inibitórios de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (em um sítio, exceto na fase S), como agentes que induzem a interrupção de G1 e interrupção da fase M. Bloqueadores clássicos da fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), Taxol® e inibidores topo II, como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposido e bleomicina. Esses agentes que capturam G1 também se espalham na captura da fase S, por exemplo, agentes alcalinizantes de DNA como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-flúor-uracila e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, e antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadélfia, 1995), especialmente pág. 13.

Um "agente quimioterápico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterápicos incluem agentes alquilantes como tiotepa e ciclosfosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonados como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacin e bulatacinona); delta-9-tetraidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotecina (incluindo o análogo sintético de topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®),

acetilcamptotecina, scoplectina e 9-aminocamptotecina); briostatina;
 calistatina; CC-1065 (incluindo adozelesina, carzelesina e análogos sintéticos
 de bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas
 (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina
 5 (incluindo os análogos sintéticos de KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina;
 pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio
 como clorambucila, clornafazina, clolofosfamida, estramustina, ifosfamida,
 mecloretamina, hidrocloreto óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina,
 fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosureas como
 10 carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, e ranimustina;
 antibióticos como os antibióticos enedina (por exemplo, caliqueamicina,
 especialmente caliqueamicina gama11 e caliqueamicina omega 11 (ver, por
 exemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina,
 incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como cromóforos de
 15 neocarzinostatina e cromóforos de antibióticos enedina relacionados a
 cromoproteínas) aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina,
 bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina,
 cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-
 norleucina, doxorubicina (incluindo ADRIAMYCIN® morfolino-doxorubicina,
 20 cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, injeção de lipossomo
 HC1 doxorubicina (DOXIL®) e deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina,
 idarubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido
 micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina,
 puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina,
 25 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabólitos como
 metotrexato, gencitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina
 (XELODA®), uma epotilona, e 5-flúor uracil (5-FU); análogos do ácido fólico
 como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos purina tais

como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos da
 pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina,
 dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos como
 calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano,
 5 testolactona; anti-adrenais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; ácido
 fólico restabelecedor como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de
 aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; ansacrina; bestrabucila;
 bisantrena; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina;
 acetato de eliptínio; etoglucídeo; nitrato de gálio; hidroxíurea; lentinan;
 10 lonidainina; maitansinóides como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona;
 mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina;
 losoxantrona; 2-etil hidrazida; procarbazona; complexos polissacarídeos PSK[®]
 (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirana;
 espirogermânio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2"-triclóro trietil amina;
 15 tricótecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina);
 uretano; vindesina (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); dacarbazina; manomustina;
 mitobronitol; mitolactol; pipobromana; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); tiotepa;
 taxóides, por exemplo, paclitaxel (TAXOL[®]), formulação de paclitaxel de
 nanopartículas de albumina modificada geneticamente (ABRAXANE[™]) e
 20 doxetaxel (TAXOTERE[®]); cloranbucila; 6-tioguanina; mercaptopurina;
 metotrexato; análogos da platina como cisplatina e carboplatina; vinblastina
 (VELBAN[®]); platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina
 (ONCOVIN[®]); oxaliplatina; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE[®]);
 novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor da
 25 topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides como ácido
 retinóico; sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer
 um destes acima, bem como combinações de dois ou mais destes acima como
 CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de ciclofosfamida,

doxorubicina, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviação para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATIN™) combinado com 5-FU e leucovorina.

Também incluídos nesta definição estão os agentes anti-
 5 hormonais que agem para regular, reduzir, bloquear ou inibir os efeitos de hormônios que podem promover o crescimento do câncer, e estão muitas vezes na forma de tratamento sistêmico ou do corpo inteiro. Eles podem ser os próprios hormônios. Exemplos incluem anti-estrógenos e moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs), incluindo, por exemplo,
 10 tamoxifeno (incluindo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, e toremifene (FARESTON®); anti-progesteronas; infra-reguladores de receptores de estrógeno (ERDs); agentes com função de supressão ou fechamento dos ovários, por exemplo, hormônios que liberam hormônios
 15 luteinizante (LHRH), como acetato de leuprolida (LUPRON® e ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina e tripterelina; outros anti-androgênicos como flutamida, nilutamida e bicalutamida; e inibidores da aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrógeno na glândula adrenal, como, por exemplo, 4(5)-imidazolas,
 20 aminoglutetimida, acetato de megesterol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozola, vorozola (RIVISOR®), letrozola (FEMARA®), e anastrozola (ARIMIDEX®). Além disso, tal definição de agentes quimioterápicos inclui bisfosfonatos como clodronato (por exemplo, BONEFOS® ou OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido
 25 zoledrônico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) ou risedronato (ACTONEL®); bem como troxacitabina (um análogo da 1,3-dioxolana nucleosídeo citosina); oligonucleotídeos *antisense*, em particular aqueles que inibem expressão de

genes nas vias de sinalização envolvidas na proliferação celular anormal, como, por exemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, e receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R); vacinas como vacina THERATOPE® e vacinas de terapia gênica, por exemplo, vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN®, e vacina VAXID®; inibidor de topoisomerase 1 (por exemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por exemplo, ABARELIX®); ditosilato de lapatinib (um ErbB-2 e inibidor de molécula pequena de tirosina quinase EGFR dupla também conhecido como GW572016); inibidores de COX-2 como celcoxib (CELEBREX®; benzeno sulfonamida 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluormetil)-1H-pirazol-1-il); e sais farmacologicamente aceitáveis, ácidos ou derivados de qualquer um destes acima.

O termo "citocina" é um termo genérico para proteínas liberadas por uma população de células que age em outra célula como mediadoras intercelulares. Exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas, e hormônios polipeptídicos tradicionais. Incluídos entre as citocinas estão os hormônios de crescimento, como hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento humano N-metionil e hormônio de crescimento bovino; hormônio da paratireóide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-relaxina; hormônios de glicoproteína como hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH) e hormônio luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento do fibroblasto; prolactina; lactogênio placentário; fator- α e - β de necrose tumoral; substância de inibição mulleriana; peptídeo associado à gonadotropina de camundongo; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular (por exemplo, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E); fator de crescimento placentário (PIGF); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, por exemplo, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD); integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento do nervo, como NGF-alfa; fator de crescimento de plaquetas; fatores

transformantes do crescimento (TGFs), como TGF-alfa e TGF-beta; fator I e II de crescimento similar à insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons, como interferon-alfa, beta e gama; fatores de estimulação de colônia (CSFs) tal como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF), como CSF de macrófago (M-CSF), CSF de macrófago e granulócito (GM-CSF) e CSF de granulócito (g-CSF); interleucinas (ILs), como IL-1, IL-1alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-30; secretoglobulina/uteroglobulina; oncostatina (OMS); um fator de necrose tumoral, como TNF-alfa ou TNF-beta e outros fatores polipeptídicos, incluindo LIF e kit ligante (KL). Como usado no presente pedido, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante, e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

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. Ver, 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 beta-lactama, 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 quimioterápicos descritos acima.

5 Um “fator ou agente angiogênico” é um fator de crescimento que estimula o desenvolvimento dos vasos sanguíneos, por exemplo, promove a angiogênese, crescimento endotelial, estabilidade dos vasos sanguíneos e/ou vasculogênese, etc. Por exemplo, fatores angiogênicos, incluem, mas não se limitam a, por exemplo, VEGF e membros da família VEGF, PlGF, família PDGF, fator hereditário de crescimento de fibroblasto (FGFs), ligantes TIE (Angiopoietinas), efrinas, ANGPTL3, ANGPTL4, etc. Também inclui fatores que aceleram a cicatrização, como hormônio do crescimento, fator I de crescimento similar à insulina (IGF-I), VEGF, fator de crescimento epidermal (EGF), CTGF e membros desta família, e TGF- α e TGF- β . Ver, por exemplo, 10 Klagsbrun e D’Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit e Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por exemplo, Tabela 1 listando fatores angiogênicos) e, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003).

20 Um “agente anti-angiogênese” ou “inibidor de angiogênese” refere-se a uma substância de peso molecular pequeno, um polinucleotídeo, um polipeptídeo, uma proteína isolada, uma proteína recombinante, um anticorpo, ou proteínas conjugadas ou proteínas de fusão destes, que inibem a angiogênese, vasculogênese ou permeabilidade vascular, tanto diretamente 25 como indiretamente. Por exemplo, um agente anti-angiogênese é um anticorpo ou outro antagonista para um agente angiogênico, como definido acima, por exemplo, anticorpos para VEGF, anticorpos para receptores de VEGF, moléculas pequenas que bloqueiam a sinalização do receptor de VEGF (por

exemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Agentes anti-angiogênese também incluem inibidores de angiogênese nativos, por exemplo, endostatina, etc. Ver, 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 anti-angiogênica em melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):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 anti-angiogênicos usados em testes clínicos).

O termo "agente imunossupressivo", como usado no presente pedido, refere-se a substâncias que agem para suprimir ou mascarar o sistema imune do mamífero sendo tratado no presente pedido. Estes agentes incluiriam substâncias que suprimem a produção de citocinas, infra-regulam ou suprimem a auto-expressão de antígeno, ou mascaram os antígenos MHC. Exemplos de tais agentes incluem pirimidinas substituídas por 2-amino-6-aryl-5 (ver patente US 4.665.077); drogas antiinflamatórias não esteroidais (NSAIDs), ganciclovir, tacrolimus, glicocorticóides como cortisol ou aldosterona, agentes antiinflamatórios como um inibidor da ciclo-oxigenase, um inibidor da 5-lipoxigenase, ou um antagonista do receptor de leucotrieno, antagonistas da purina como azatioprina ou micofenolato mofetil (MMF), agentes alquilantes como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona, glutaraldeído (que mascara os antígenos MHC, como descritos na patente US 4.120.649); anticorpos anti-idiotípicos para antígenos MHC e fragmentos MHC; ciclosporina A; 6 mercaptopurina, esteróides como corticoesteróides ou glicocorticoesteróides ou análogos de glicocorticóides, como predsona, metilprednisolona e dexametasona, inibidores da dihidrofolato redutase como metotrexato (oral ou subcutâneo), hidróxicloriquona, sulfasalazina,

leuflunomida, citocina ou anticorpos ou antagonistas do receptor de citocina incluindo anticorpos anti-interferon alfa, beta ou gama, anticorpos anti-fator alfa necrose tumoral (infiximab ou adalimumab), imunoadesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticorpos anti-fator beta de necrose tumoral, anticorpos anti-leucina-2 (IL-2) e anticorpos anti-receptor IL-2; anticorpos anti-LFA-1, incluindo anticorpos anti-CD11a e anti-CD18; anticorpos anti-L3T4; globulina heteróloga anti-linfócito; anticorpos pan-T, preferivelmente anticorpos anti-CD3 ou anti-CD4/CD4a; peptídeo solúvel contendo um domínio de ligação LFA-3 (documento WO 1990/08187, publicado em 26 de julho de 1990); estreptoquinase; TGF-beta); estreptodornase; RNA ou DNA do hospedeiro; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de célula T (Cohen *et al.*, patente US 5.114.721); fragmentos do receptor de célula T (Offner *et al.*, *Science*, 251: 430-432 (1991); documento WO 1990/11294; laneway, *Nature*, 341: 48 (1989); e documento WO 1991/01133); e anticorpos receptores de célula T (patente EP 340.109) como T10B9.

Exemplos de “drogas antiinflamatórias não esteroidais” ou “NSAIDs” são ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno, indometacina, sulindaco, tolmetina, incluindo sais e derivados destes, etc.

A palavra “marcador”, quando usada no presente pedido, refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugada diretamente ou indiretamente ao polipeptídeo. O marcador pode ser detectável por si mesmo (por exemplo, radioisótopos marcadores ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar alteração química de um composto ou composição do substrato que é detectável.

Uma molécula “isolada” de ácido nucléico é uma molécula de ácido nucléico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucléico contaminante com que ela geralmente está associada na fonte natural de ácido nucléico do polipeptídeo. Uma molécula isolada de ácido

nucléico é diferente na forma ou configuração na qual é encontrada na natureza. Moléculas isoladas de ácido nucléico são então distintas das moléculas de ácido nucléico existentes nas células naturais. No entanto, uma molécula isolada de ácido nucléico inclui uma molécula de ácido nucléico contida nas células que normalmente expressam o polipeptídeo onde, por exemplo, a molécula de ácido nucléico está em um sítio do cromossomo diferente daquele nas células naturais.

TUMORES RESISTENTES

A invenção está baseada, em parte, na descoberta de eventos celulares e moleculares que levam à resistência de tumores para terapia contra câncer, que compreende pelo menos uma antagonista do VEGF. Uma correlação entre o recrutamento de células hematopoiéticas derivadas da medula óssea e o desenvolvimento da resistência do tumor ao tratamento com anti-VEGF é mostrada no presente pedido.

O sistema imune inclui células hematopoiéticas, que incluem eritrócitos, linfócitos e células da linhagem mielóide. Todos estes tipos celulares se originam das mesmas células-tronco pluripotentes. Em um adulto, a hematopoiese ocorre na medula óssea, onde as células-tronco raramente se dividem para produzir mais células-tronco (auto-renovação) e várias células progenitoras comprometidas. São as células progenitoras comprometidas que produzem uma célula hematopoiética em resposta a fatores reguladores específicos. Estes fatores regulatórios são primeiramente produzidos pelas células estromais ao redor e em outros tecidos, e incluem, por exemplo, fatores estimulantes de colônia (CSFs), eritropoietina (EPO), interleucina 3 (IL3), granulócito/macrófago CSF (GM-CSF), granulócito CSF (G-CSF), macrófago CSF (M-CSF) e fator STEEL. Sugeriu-se que alterações nos sistemas imune em pacientes com câncer contribuem na inabilidade ou habilidade reduzida do sistema imune em montar corretamente um ataque contra o câncer, permitindo

assim a progressão do crescimento do tumor. Ver, por exemplo, Gabrilovich *et al.*, Antibodies to Vascular Endothelial Growth Factor Enhances the Efficacy of Cancer Immunotherapy by Improving Endogenous Dendritic Cell Function, *Clinical Cancer Research* 5:2963-2970 (1999).

5 Fatores produzidos por tumores podem levar à mielopoiese anormal e pode levar à supressão da resposta imune para o tumor. Ver, por exemplo, Kusmartsev e Gabrilovich, Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother*. 51:293-298 (2002). A invenção fornece fatores específicos de células de tumor resistentes
10 e células CD11b+Gr1+ que podem estar envolvidas na resistência do tumor ao tratamento com antagonista do VEGF. Por exemplo, o fracionamento salino de tumores resistentes também resultou em fatores que podem fornecer resistência, direta ou indiretamente. Ver, por exemplo, **Fig. 8** e Exemplo 2 no presente pedido. A mobilização e a ativação de células mielóides CD11b+Gr1+
15 pode representar duas etapas no desenvolvimento da resistência ao tratamento com anti-VEGF.

A invenção também fornece métodos e composições para combinação de tratamento que usam agentes dirigidos às células mielóides e
20 agentes quimioterápicos, conforme descrito no presente pedido, com anti-VEGF. Essas combinações de tratamento podem suprimir a angiogênese e o crescimento, e/ou atrasar o princípio da resistência ao anti-VEGF.

CÉLULAS CD11B+GR1

A família CD11/CD18 está estruturalmente e geneticamente relacionada a uma família maior de receptores integrina que modulam as
25 interações de adesão celular, incluindo embriogênese, adesão a substratos extracelulares e diferenciação celular (Hynes, R. O., *Cell* 48: 549-554 (1987); Kishimoto *et al.*, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989); Kishimoto *et al.*, *Cell* 48: 681-690 (1987) e Ruoslahti *et al.*, *Science* 238: 491-497 (1987)). As integrinas

são uma classe de heterodímeros que atravessam a membrana, que compreendem uma subunidade α em associação não covalente com uma subunidade β . As subunidades β geralmente são capazes de se associar a mais de uma subunidade α e os heterodímeros que compartilham uma subunidade β foram classificados como subfamílias dentro da população de integrina (Larson e Springer, Structure and function of leukocyte integrins, *Immunol. Rev.* 114: 181-217 (1990)).

Descobriu-se que as moléculas de integrina da família CD11/CD18 e seus ligantes celulares mediam várias interações célula-célula, especialmente na inflamação. Estas proteínas demonstraram ser críticas para funções de adesão no sistema imune (Kishimoto *et al.*, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989)). Anticorpos monoclonais para LFA-1 mostraram bloquear a adesão de leucócitos para células endoteliais (Dustin *et al.*, *J. Cell. Biol.* 107: 321-331 (1988); Smith *et al.*, *J. Clin. Invest.* 83: 2008-2017 (1989)) e inibir a ativação de célula T (Kuypers *et al.*, *Res. Immunol.*, 140: 461 (1989)), formação de conjugado necessária para destruir CTL específico para antígeno (Kishimoto *et al.*, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989)), proliferação de célula T (Davignon *et al.*, *J. Immunol.* 127: 590-595 (1981)) e morte de células NK (Krensky *et al.*, *J. Immunol.* 131: 611-616 (1983)).

A família CD11/CD18 de moléculas de receptor de adesão compreende quatro glicoproteínas de superfície celular altamente relacionadas: LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), p150.95 (CD11c/CD18) e (CD11d/CD18). Cada um destes heterodímeros tem uma única cadeia α (CD11a, b, c ou d) e a cadeia β constante (CD18). Integrinas CD18 localizadas em leucócitos podem se ligar à molécula-1 de adesão intracelular (ICAM-1), que é expressa no endotélio vascular e outras células, através disso, mediando a adesão de leucócitos e migração transendotelial. LFA-1 está presente na superfície de todos os leucócitos maduros, exceto em um subgrupo de

macrófagos, e é considerada a principal integrina linfoide. A expressão de Mac-1, p150.95 e CD11d/CD18 é predominantemente restrita às células da linhagem mielóide (que inclui neutrófilos, monócitos, macrófagos e mastócitos). CD11b+Gr1+ são marcadores também encontrados nas células mielóides.

- 5 Sugeriu-se também que o equilíbrio entre células mielóides maduras e imaturas seja uma indicação de câncer, e no crescimento progressivo de tumor, o equilíbrio se transfere para células mielóides imaturas com uma diminuição da função das células dendríticas. Ver, por exemplo, Kusmartsev e Gabrilovich, Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother*. 51:293-298 (2002). A alteração do equilíbrio, por exemplo, pela diferenciação de células mielóides imaturas em camundongos portadores de tumores forneceu o efeito de vacinas contra o câncer. Ver, Kusmartsev *et al.*, All-trans-Retinoic Acid Eliminates Immature Myeloid Cells from Tumor-bearing Mice and Improves the Effect of Vaccination. *Cancer Research* 63:4441-4449 (2003).
- 10
- 15 Observou-se que em pacientes com câncer, o nível de VEGF na circulação estava correlacionado com um aumento no número de células mielóides imaturas. Ver, Almand *et al.*, Clinical significance of defective dendritic cells differentiation in cancer. *Clin. Cancer Res*. 6:1755 (2000).

- 20 É mostrado no presente pedido que a mobilização e a ativação de células mielóides CD11b+Gr1+ pode resultar na resistência ao tratamento com anti-VEGF. Também é mostrado que células mielóides CD11b+Gr1+ derivadas da medula óssea, isoladas de camundongos portadores de tumores, podem conferir resistência nos tumores ao tratamento com anti-VEGF e meio condicionado de resistentes ao anti-VEGF (mas não tumores sensíveis ao anti-VEGF) estimulou migração de células CD11b+Gr1+.
- 25

DIAGNÓSTICOS

A invenção também fornece métodos e composições para diagnóstico de um tumor resistente ao tratamento com antagonista do VEGF.

Em certas realizações da invenção, métodos da invenção comparam os níveis de expressão de uma ou mais CD11b+Gt1+ ou de ácidos nucleicos de tumores resistentes em populações de células de teste e de referência. A informação da sequência divulgada no presente pedido, unida aos métodos conhecidos na técnica para detecção de ácido nucleico, permite a detecção e a comparação de vários transcritos divulgados. Em outra realização, métodos da invenção comparam o tamanho do baço de um sujeito com a resistência do tumor, em comparação ao tamanho do baço de referência. Em uma realização, o tamanho do baço é o tamanho do baço do sujeito quando este estava sem o tumor, ou quando o sujeito era sensível ao tratamento com antagonista do VEGF. Em outra realização, o tamanho do baço de referência é uma média de tamanho de baço de outros sujeitos sem tumor, ou uma média de tamanho de baço de outros sujeitos com tumores sensíveis. O tamanho do baço pode ser medido usando-se métodos conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a técnicas de imagem não invasiva, como ultra-som, ultra-sonografia unidimensional (US), varredura por radionuclídeos, tomografia computadorizada (CT) e imagem por ressonância magnética. Ver, por exemplo, Yang *et al.*, *West J Med.*; 155(1): 47–52 (1991). Em ainda outra realização, métodos da invenção comparam a área de superfície vascular de um tumor em um sujeito com tumor resistente à uma área de superfície vascular de referência.

Em certas realizações da invenção, a invenção inclui o fornecimento de uma população de células de teste que inclui pelo menos uma célula que é capaz de expressar uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codifica uma proteína ou que é a proteína, em que a proteína é Gr1, uma elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP e/ou DRRTTP. Por “capaz de expressar” entende-se que o gene está presente na forma intacta na célula e pode ser expresso. A expressão de uma, algumas ou

todas as sequências é então detectada, se presente, e medida. Usando-se a informação de sequência fornecida pelos lançamentos de dados para as sequências conhecidas ou para o chip fabricado, as sequências podem ser detectadas (se expressas) e medidas, usando-se técnicas bem conhecidas pelos técnicos no assunto. Por exemplo, sequências dentro dos lançamentos de dados de sequências correspondentes aos ácidos nucleicos que codificam Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTP podem ser usadas para a construção de sondas para detectar sequências de RNA correspondentes, por exemplo, nas análises de hibridização por *northern blot* ou métodos que especificamente e, preferencialmente, amplificam quantitativamente sequências específicas de ácido nucleico. Como outro exemplo, as sequências podem ser usadas para se construir *primers* para amplificarem, especificamente, os ácidos nucleicos que codificam Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou sequências DRRTP, por exemplo, métodos de detecção baseados na amplificação, como reação em cadeia da polimerase baseada em transcrição reversa. Quando alterações na expressão gênica estão associadas com a amplificação ou deleção de genes, as comparações de sequências nas populações de teste e de referência podem ser feitas pela comparação de quantidades relativas das sequências de DNA examinadas nas populações de células de teste e de referência.

A expressão também pode ser medida pelo nível de proteína, isto é, pela medição dos níveis de polipeptídeos codificados pelos produtos genes descritos no presente pedido. Tais métodos são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, imunoenaios baseados em anticorpos para proteínas codificadas pelos genes. O nível de expressão de uma ou mais sequências de Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTP na população de teste é então comparado aos níveis de expressão das

sequências em uma ou mais células de uma população de células de referência. A expressão das sequências nas populações de células de teste e de controle pode ser comparada usando-se qualquer método reconhecido na técnica para comparação de expressão de sequências de ácido nucléico. Por exemplo, a expressão pode ser comparada usando-se métodos GENE CALLING.RTM., como descrito na patente US 5.871.697 e em Shimkets *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 17:798-803. Em certas realizações da invenção, é medida a expressão de uma, duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais, dez ou mais, onze ou mais, doze ou mais, treze ou mais, quatorze ou mais, quinze ou mais, vinte ou mais, vinte e cinco ou mais, ou de todas as sequências que codificam Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP e/ou DRRTTP.

A população de células de referência inclui uma ou mais células capazes de expressar as sequências medidas de Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTTP, e para cada uma o parâmetro é conhecido, por exemplo, tumor sensível a um antagonista do VEGF. Em certas realizações da invenção, a sequência de Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTTP em uma população de células de teste é considerada comparável, em relação ao nível de expressão, ao nível de expressão da sequência de Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTTP na população de células de referência, se seu nível de expressão varia dentro de um fator menor ou igual a 2 vezes o nível de transcritos Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTTP na população de células de referência. Em várias realizações, a sequência de Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTTP em uma população de células de teste pode ser considerada alterada

nos nível de expressão, se seu nível de expressão variar 2 vezes em relação ao nível de expressão das sequências correspondentes de Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTTP na população de células de referência.

5 Opcionalmente, a comparação de sequências expressas de modo diferente entre uma população de células de teste e uma população de células de referência pode ser feita em relação a um ácido nucléico controle, cuja expressão é independente do parâmetro ou condição sendo medida. Os níveis de expressão do ácido nucléico controle no ácido nucléico de teste e de
10 referência pode ser usado para normalizar os níveis do sinal nas populações comparadas. Os ácidos nucléicos adequados podem facilmente ser determinados por um técnico no assunto.

 A população de células de teste pode ser qualquer uma de várias células, isto é, uma ou mais células, e pode ser fornecida *in vitro*, *in vivo* ou *ex*
15 *vivo*.

 Em certas realizações, as células na população de células de referência são derivadas de um tipo celular o mais próximo possível da célula de teste, por exemplo, célula tumoral. Em algumas realizações, a célula controle é derivada do mesmo sujeito, como célula de teste, por exemplo, de uma região
20 próxima da região de origem da célula de teste ou de um período em que o sujeito era sensível ao tratamento com antagonista do VEGF. Em uma realização da invenção, a população de células de referência é derivada de diversas células. Por exemplo, a população de células de referência pode ser um banco de dados do padrão de expressão de células previamente testadas, para as quais a sensibilidade
25 do tumor ao tratamento com antagonista do VEGF é conhecida.

AValiação da Sensibilidade do Tumor

O recrutamento de células mielóides CD11b+GR1+, e a expressão de algumas das sequências de URCGP, DRCGP, URRTP ou

DRRTP, descritas no presente pedido, está correlacionada com tumores resistentes ao tratamento com antagonista do VEGF. Dessa forma, em um aspecto, a invenção fornece um método de avaliação de sensibilidade ao antagonista do VEGF em um sujeito, onde a sensibilidade ao antagonista refere-se à habilidade em tratar um tumor com anti-VEGF. Em uma realização da invenção, um método inclui o fornecimento de uma ou mais populações de células de teste do sujeito, que inclui células capazes de expressar uma ou mais sequências de ácido nucléico homólogas à sequência de ácido nucléico que codifica URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTP. A expressão das sequências é comparada a uma população de células de referência. Qualquer população de células de referência pode ser usada, contanto que o padrão de sensibilidade ao antagonista do VEGF, da população de células de referência, seja conhecido. A comparação pode ser realizada nas amostras de referência e de teste, medida ao mesmo tempo ou em períodos diferentes. Um exemplo desta última é o uso de informação de expressão compilada, por exemplo, em um banco de dados de sequência, que junta informações sobre os níveis de expressão de sequências conhecidas nas células, cujo padrão de sensibilidade é conhecido. Em certas realizações da invenção, a população de células de referência é aprimorada para células mielóides CD11b+Gr1+. Em certas realizações da invenção, a população de células de referência é aprimorada para células tumorais.

CONJUNTOS DE DIAGNÓSTICO OU MARCADORES

A invenção também fornece conjuntos de marcadores para identificar tumores resistentes. Em certas realizações, estes conjuntos de marcadores são fornecidos em um kit para avaliar a sensibilidade ou a resistência do tumor ao tratamento com antagonista do VEGF. Por exemplo, um conjunto de marcador pode incluir duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais,

dez ou mais, doze ou mais, treze ou mais, quatorze ou mais, quinze ou mais, vinte ou mais, vinte e cinco ou mais, ou um conjunto completo de moléculas. A molécula é um ácido nucléico que codifica uma proteína ou uma proteína com uma expressão e/ou atividade alterada, e é selecionada destes a seguir:

5 Notch2, DMD8, MCP-1, ITGB7, G-CSF, IL-8R, MIP2, MSCA, GM-CSF, IL-1R, Meg-SF, HSP1A, IL-1R, G-CSFR, IL10-R1, Erb-2.1, Caveolina3, Semcap3, INTG4, THBSP-4, ErbB3, JAM, Eng, JAM, Eng, JAM-2, Pecam1, Tlr3, elastase de neutrófilo, CD14, expi, IL-13R, LDLR, TLR-1, RLF, Endo-Lip, SOCS13, FGF13, IL-4R, THBS1, Crea7, Aquaporina-1, SCF38, APOE, FABP, IL-11R, IL-10 1RII, IFN TM1, TNFRSF18, WNT5A, carreador secretório de membrane 1, HSP86, EGFR, EphRB2, GPCR25, HGF, Angiopietina Like-6, Eph-RA7, Semaforina Vlb, Neurotrofina 5, Claudina-18, MDC15, ECM, ADAMTS7B, NCAM-140, Fibronectina tipo III, WIP, CD74, ICAM-2, Jagged1, Itga4, ITGB7, TGF-BII-R, TGFb IEP, Smad4, BMPR1A, CD83, Dectina-1, CD48, E-selectina, 15 IL-15, Supressor de sinalização de citocina 4, Cyt4, CX3CR1, IGF2, HSP9A, FGF18, ELM1, Ldgfa, receptor de resgate tipo A, Lectina tipo C de macrófago, Pigr3, Macrófago SRT-1, receptor de acoplamento de proteína G, ScyA7, IL-1R2, proteína induzível IL-1, IL-1 beta, Precursor ILIX , TGF-B, FIZZ1, Wfs1, TP 14A, EMAP, SULF-2, matriz extracelular 2, CTFG, TFPI, XCP2, Ramp2, 20 ROR-alfa, Efrina B1, SPARC-like 1 e Semaforina A. Em uma realização da injeção, é fornecido um anticorpo que detecta a proteína. Em uma realização, as moléculas são derivadas de células CD11b+Gr1+ e incluem, por exemplo, IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, THBS1 e Crea7. Em outra realização, as moléculas são derivadas de tumores resistentes e incluem, por 25 exemplo, MSCA, MIP2, IL-8R, G-CSF, IL10-R2, THBSP-4 e JAM-2.

MODULADORES E USOS DESTES

Os moduladores de VEGF, Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, CD11b, CD18, URCGPs, DRCGPs, URRTPs e DRTRPs são

moléculas que modulam a atividade destas proteínas, por exemplo, agonistas e antagonistas. O termo “agonista” é usado para se referir a análogos peptídicos e não peptídicos da proteína da invenção, e aos anticorpos que se ligam, especificamente, a tais proteínas da invenção, desde que eles tenham a habilidade de fornecer um sinal agonista. O termo “agonista” é definido no contexto do papel biológico da proteína. Em certas realizações, os agonistas possuem as atividades biológicas de uma proteína nativa da invenção, por exemplo, para VEGF. O termo “antagonista” é usado para se referir a moléculas que têm a habilidade de inibir a atividade biológica de uma proteína da invenção. Os antagonistas podem ser avaliados, por exemplo, pela inibição da atividade da proteína.

USOS TERAPÊUTICOS

Está contemplado que, de acordo com a invenção, as combinações de moduladores, incluindo antagonista do VEGF, agente de redução de célula mielóide e outros agentes terapêuticos podem ser usados para tratar neoplasmas ou condições não neoplásicas. Em uma realização, moduladores, por exemplo, antagonistas do VEGF, agentes de redução de célula mielóide, antagonistas de URCGPs e URRTPs (“antagonistas da invenção”), são usados na inibição de células cancerosas ou crescimento de tumor para tumores resistentes. Em certas realizações da invenção, moduladores, por exemplo, agonistas de DRCGPs e DRRTTPs (“agonistas da invenção”), são usados para inibir células cancerosas ou crescimento de tumor. Está contemplado que, de acordo com a invenção, antagonistas da invenção podem ser usados para inibir metástase de um tumor. Em certas realizações, um ou mais agentes anti-câncer podem ser administrados com antagonistas da invenção e/ou agonistas da invenção, para inibir células cancerosas ou crescimento de tumor. Ver também a seção denominada Combinação de Terapias no presente pedido.

Exemplos de disfunções neoplásicas a serem tratadas no presente pedido incluem, mas não se limitam às aquelas descritas pelos termos câncer ou cancerosa. Condições não neoplásicas que são receptivas ao tratamento com antagonistas da invenção incluem, mas não se limitam a, por exemplo, hipertrofia indesejada ou anormal, artrite, artrite reumatóide (RA), psoríase, placas psoriáticas, sarcoidose, arterioesclerose, placas arterioescleróticas, edema de infarto do miocárdio, retinopatia diabética e outras retinopatias proliferativas incluindo retinopatia da prematuridade, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneração macular relativa à idade, neovascularização da córnea, neovascularização de enxerto de córnea, rejeição de enxerto de córnea, neovascularização da retina/coroidal, neovascularização da íris (rubeose), doenças neovasculares oculares, restenose vascular, deformações arteriovenosas (AVM), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias da tireóide (incluindo doenças de Grave), da córnea e outro tecido de transplante, inflamação crônica, inflamação de pulmão, lesão/ARDS aguda de pulmão, sepsia, hipertensão pulmonar primária, efusão pulmonar maligna, edema cerebral (por exemplo, associados com derrame agudo/lesão intracraniana /trauma), inflamação sinovial, pano formação em RA, miosite ossificante, formação de osso hipertrófica, osteoartrite (OA), ascites refratárias, doenças policísticas ovarianas, endometrioses, doenças de fluido do terceiro espaço (pancreatites, síndrome de compartimento, queimaduras, doenças de intestino), fibróide uterina, parto prematuro, inflamações crônicas tal como IBD (doenças de Crohn e colites ulcerativas), rejeição alográfica renal, doenças inflamatórias de intestino, síndrome nefrótica, crescimento indesejado ou anormal de massa de tecido (não canceroso), obesidade, crescimento de massa de tecido adiposo, articulações hemofílicas, cicatrizes hipertróficas, inibição de crescimento de cabelo, síndrome Osler-Weber, fibroplasias retrolental granuloma piogênico,

escleroderma, tracoma, adesões vasculares, sinovites, dermatites, pré-eclampsia, ascites, efusão pericardial (como aquela associada com pericardite) e efusão pleural.

COMBINAÇÃO DE TERAPIAS

- 5 Como indicado acima, a invenção fornece terapias combinadas nas quais um antagonista do VEGF é administrado em combinação com outra terapia. Por exemplo, um antagonista do VEGF é administrado em combinação com um agente ou antagonista da invenção diferente (e/ou um agonista da invenção), para tratar tumor resistente ao tratamento com VEGF.
- 10 Em certas realizações, agentes adicionais, por exemplo, agente de redução de célula mielóide, agentes ou terapêuticos anti-câncer, agentes anti-angiogênicos ou terapêuticos anti-neovascularização podem ser administrados em combinação com anti-VEGF e um antagonista da invenção diferente, para
- 15 tratar várias condições neoplásicas ou não-neoplásicas. Em uma realização, a condição neoplásica ou não neoplásica é caracterizada pela disfunção patológica associada com a angiogênese anormal ou indesejada, que é resistente ao tratamento com antagonista do VEGF. Os antagonistas da invenção podem ser administrados em série ou em combinação com o agente terapêutico que é efetivo para aqueles propósitos, tanto na mesma composição
- 20 como em composições separadas. Alternativamente ou adicionalmente, antagonistas múltiplos, agentes e/ou agonistas da invenção podem ser administrados.

- A administração do antagonista e/ou agentes da invenção, por exemplo, agente de redução de célula mielóide, pode ser feita
- 25 simultaneamente, por exemplo, como uma composição única ou como duas ou mais composições diferentes, usando-se as mesmas ou diferentes rotas de administração. Alternativamente ou adicionalmente, a administração pode ser feita sequencialmente, em qualquer ordem. Em certas realizações, os

intervalos que variam de minutos a dias, de semanas a meses, podem estar presentes entre as administrações de duas ou mais composições. Por exemplo, o antagonista do VEGF pode ser administrado primeiro, seguido por um antagonista ou agente da invenção diferente, por exemplo, agente de
5 redução de célula mielóide (exceto um antagonista do VEGF). No entanto, a administração simultânea ou administração inicial do antagonista ou agente da invenção diferente está também contemplada.

As quantidades efetivas dos agentes terapêuticos administrados em combinação com um antagonista do VEGF será de acordo com a descrição
10 do médico ou veterinário. A administração e ajuste da dosagem são feitos para atingir o gerenciamento máximo das condições a serem tratadas. A dose dependerá adicionalmente de tais fatores, como o tipo de agente terapêutico a ser usado e o paciente específico a ser tratado. Dosagens adequadas para o antagonista do VEGF são aquelas atualmente usadas e podem ser diminuídas
15 devido a ação combinada (sinergia) do antagonista do VEGF e o antagonista diferente da invenção. Em certas realizações, a combinação dos inibidores potencializa a eficácia de um único inibidor. O termo "potencializa" refere-se a um aprimoramento na eficácia de um agente terapêutico, em sua dose comum ou aprovada. Ver, também, a seção denominada Composições Farmacêuticas
20 no presente pedido.

A terapia anti-angiogênica em relação ao câncer é uma nova estratégia de tratamento de câncer voltada para a inibição do desenvolvimento de vasos sanguíneos no tumor, necessários para fornecer nutrientes e manter o crescimento do tumor. Devido à angiogênese estar envolvida tanto no
25 crescimento do tumor primário como metástase, o tratamento anti-angiogênico fornecido pela invenção é capaz de inibir o crescimento neoplásico do tumor no local primário, bem como prevenir metástases de tumor nos locais secundários, permitindo então o ataque aos tumores por outros terapêuticos. Em uma

realização da invenção, o agente ou terapêutico anti-câncer é um agente anti-angiogênico. Em outra realização, o agente anti-câncer é um agente quimioterápico.

Muitos agentes anti-angiogênicos foram identificados e são conhecidos na técnica, incluindo aqueles listados no presente pedido, por exemplo, listados nas Definições e, por exemplo, por Carmeliet e Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara *et al.*, *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004) e Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003). Ver, também, pedido de patente US 20030055006. Em uma realização, um antagonista da invenção é usado em combinação com um anticorpo que neutraliza anti-VEGF (ou fragmento) e/ou outro antagonista do VEGF ou um antagonista do receptor do VEGF, incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, receptores do VEGF solúvel (por exemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilinas (por exemplo, NRP1, NRP2)) fragmentos, aptâmeros capazes de bloquear VEGF ou VEGFR, anticorpos que neutralizam anticorpos anti-VEGFR, moléculas de baixo peso molecular inibidoras do VEGFR tirosina quinase (RTK), estratégias *antisense* para o VEGF, ribozimas contra VEGF ou receptores do VEGF, antagonistas variantes do VEGF e qualquer combinação destes. Alternativamente ou adicionalmente, dois ou mais inibidores da angiogênese podem ser co-administrados ao paciente em adição ao antagonista do VEGF e outro agente da invenção. Em certas realizações, um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, agentes anti-câncer podem ser administrados em combinação com um agente da invenção, antagonista do VEGF e/ou um agente anti-angiogênese.

Em certas realizações da invenção, outros agentes terapêuticos úteis para combinação de terapia contra tumor com antagonistas da invenção incluem outras terapias contra o câncer ((por exemplo, cirurgias, tratamentos radiológicos (por exemplo, envolvendo radiação ou administração de

substâncias radioativas))), quimioterapia, tratamento com agentes anti-câncer listados no presente pedido e conhecidos na técnica, ou combinação destes. Alternativamente ou adicionalmente, dois ou mais anticorpos que se ligam ao mesmo ou a dois ou mais antígenos diferentes, divulgados no presente pedido, podem ser co-administrados ao paciente. Algumas vezes, pode também ser benéfico administrar uma ou mais citocinas ao paciente.

AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

Em certos aspectos, a invenção fornece um método de bloqueio ou redução do crescimento de tumores resistentes ou crescimento de uma célula cancerosa, pela administração de quantidades efetivas de VEGF e um antagonista da invenção, e um ou mais agentes quimioterápicos a um paciente suscetível ao câncer ou diagnosticado com câncer. Uma variedade de agentes quimioterápicos pode ser usada nos métodos de tratamento combinado da invenção. É fornecida uma lista de agentes quimioterápicos exemplares e não limitantes contemplados no presente pedido nas "Definições".

Será entendido pelos técnicos no assunto que doses apropriadas dos agentes quimioterápicos geralmente estarão em torno daquelas já empregadas nas terapias clínicas, em que quimioterápicos são administrados isoladamente ou em combinação com outros quimioterápicos. Variação nas doses provavelmente ocorrerá, dependendo da condição a ser tratada. O médico que administra o tratamento será capaz de determinar a dose apropriada para o sujeito específico.

RECIDIVA DE CRESCIMENTO TUMORAL

A invenção também fornece métodos e composições para inibição ou prevenção de recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de célula cancerosa. Recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de célula cancerosa é usada para descrever uma condição em que pacientes foram submetidos ou tratados com uma ou mais terapias atualmente

disponíveis (por exemplo, terapias de câncer, como quimioterapia, terapia de radiação, cirurgia, terapia hormonal e/ou terapia/imunoterapia biológica, terapia com anticorpo anti-VEGF, particularmente um regime terapêutico padrão para o câncer específico) que não foi clinicamente adequada para tratar os pacientes, ou os pacientes não receberam mais qualquer efeito benéfico da terapia, de forma que estes pacientes precisam de terapia efetiva adicional. Como usado no presente pedido, a frase também pode se referir a uma condição do paciente “não responsivo/refratário”, por exemplo, que descreve pacientes que respondem à terapia ainda sofrendo dos efeitos colaterais, desenvolvem resistência, não respondem à terapia, não respondem satisfatoriamente à terapia, etc. Em várias realizações, um câncer é de recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de célula cancerosa quando o número de células cancerosas não foi reduzido significativamente, aumentou, ou tamanho do tumor não foi reduzido significativamente, aumentou ou fracassou em qualquer redução adicional no tamanho ou no número de células cancerosas. Pode-se determinar *in vivo* ou *in vitro* se as células cancerosas são de recidiva de crescimento tumoral ou de recidiva de crescimento de célula tumoral, por qualquer método de avaliação da efetividade ou tratamento de células cancerosas conhecido na técnica, usando-se os significados aceitos pela técnica para tal contexto: “recidiva”, “refratário” ou “não responsivo”. Um tumor resistente ao tratamento com anti-VEGF é um exemplo de uma recidiva de crescimento tumoral.

A invenção fornece métodos de bloqueio ou redução de recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de célula cancerosa em um sujeito, pela administração de um ou mais antagonistas da invenção para bloquear ou reduzir a recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de célula cancerosa em um sujeito. Em certas realizações, o antagonista pode ser administrado depois dos terapêuticos contra o câncer.

Em certas realizações, os antagonistas da invenção são administrados simultaneamente à terapia contra o câncer, por exemplo, quimioterápico. Alternativamente ou adicionalmente, a terapia antagonista se alterna com outra terapia contra o câncer, que pode ser realizada em qualquer ordem. A

5 invenção também abrange métodos para administrar um ou mais anticorpos inibidores para prevenir o princípio ou recorrência de câncer em pacientes predispostos a ter câncer. Geralmente, o sujeito foi ou está ao mesmo tempo sendo submetido à terapia contra câncer. Em uma realização, a terapia contra

10 câncer é um tratamento com um agente anti-angiogênese, por exemplo, um antagonista do VEGF. O agente anti-angiogênese inclui aqueles conhecidos na técnica e aqueles encontrados nas Definições no presente pedido. Em uma realização, o agente anti-angiogênese é um anticorpo anti-VEGF ou fragmento que neutraliza o VEGF (por exemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN[®] (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Ver,

15 por exemplo, patentes US 6.582.959, 6.884.879, 6.703.020; documento WO 98/45332; documento WO 96/30046; documento WO 94/10202; patente EP 0666868B1; pedidos de patente US 20030206899, 20030190317, 20030203409 e 20050112126; Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004) e documento WO 2005012359. Agentes

20 adicionais podem ser administrados em combinação com o antagonista do VEGF e um antagonista da invenção para bloqueio ou redução de recidiva de crescimento tumoral ou recidiva de crescimento de célula cancerosa, por exemplo, ver seção denominada Combinação de Terapias no presente pedido.

Em uma realização, antagonistas da invenção ou outros

25 terapêuticos que reduzem a expressão de Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGs or URRTPs, são administrados para reverter a resistência ou reduzir a sensibilidade de células cancerosas a certos hormônios biológicos (por exemplo, antagonista, que é um anticorpo anti-VEGF), radiação e agentes

quimioterápicos, através disso, resensibilizando as células de câncer para um ou mais destes agentes que podem ser então administrados (ou continuar a ser administrado) para tratar ou gerenciar o câncer, incluindo a prevenção.

ANTICORPOS

5 Anticorpos da invenção incluem anticorpos de uma proteína da invenção e fragmento de anticorpo de um anticorpo ou de uma proteína da invenção. Um polipeptídeo ou proteína da invenção inclui, mas não se limita a VEGF, Gr1, MCP-1, MIP-1 alfa, CD11b, CD18, elastase de neutrófilo, URCGP, DRCGP, URRTP e DRRTTP. Em certos aspectos, um polipeptídeo ou proteína
10 da invenção é um anticorpo contra VEGF, Gr1, MCP-1, MIP-1 alfa, CD11b, CD18, URCGP, DRCGP, URRTP e DRRTTP, por exemplo, para informações gerais sobre polipeptídeos ou proteínas fornecidas no presente pedido.

Anticorpos da invenção incluem, ainda, anticorpos que são agentes anti-angiogênese ou inibidores da angiogênese, anticorpos que são
15 agentes de redução de célula mielóide, anticorpos para VEGF, Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, CD11b, CD18, URCGPs, DRCGPs, URRTPs e DRRTTPs, anticorpos que são agentes anti-câncer ou outros anticorpos descritos no presente pedido. Anticorpos exemplares incluem, por exemplo, anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, fragmentos,
20 multiespecíficos, heteroconjugados, multivalentes, de função efetora, etc.

ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos da invenção podem compreender anticorpos policlonais. Métodos de preparação de anticorpos policlonais são conhecidos para os técnicos no assunto. Por exemplo, anticorpos policlonais contra um
25 anticorpo da invenção são preferencialmente cultivados em animais por múltiplas injeções subcutânea (sc) ou intraperitonal (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada, por exemplo, hemocianina de

lapa californiana, soro de albumina, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, usando-se um agente bifuncional ou de derivação, por exemplo, éster de sulfosuccinimida maleimidobenzoil (conjugação através de resíduos cisteína), N-hidróxisuccinimida (através de resíduos lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R^1 são grupos alquila diferentes.

Os animais são imunizados contra uma molécula da invenção, conjugados imunogênicos, ou derivados por combinação, por exemplo, 100 μg ou 5 μg de proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução por via intradérmica em múltiplos locais. Um mês depois, os animais são estimulados com 1/5 a 1/10 da quantidade original do peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund por injeção subcutânea em múltiplos locais. Sete a quatorze dias depois, os animais são sangrados e o soro é analisado por titulação de anticorpo. Os animais são estimulados até a titulação platô. Tipicamente, o animal é estimulado com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado com uma proteína diferente e/ou através de um reagente reticulante diferente. Conjugados também podem ser feitos na cultura celular recombinante como fusões de proteínas. Além disso, agentes de agregação como alúmen são usados adequadamente para aumentar a resposta imune.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos monoclonais contra um antígeno, descrito no presente pedido, podem ser fabricados usando-se o método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975) ou podem ser fabricados por métodos de DNA recombinante (patente US 4.816.567).

No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, como hamster ou macaco macaque, é imunizado da

forma como descrito acima para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que irão se ligar especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Linfócitos são então fundidos com uma linhagem de células de mieloma, usando-se um agente de fusão apropriado, como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma preparadas desta forma são semeadas e cultivadas em meio de cultura adequado, que contém tipicamente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não contêm a enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura selecionado para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência em HGPRT.

Células de mieloma típicas são aquelas que se fundem eficientemente, apóiam a produção de anticorpos estáveis em alto nível pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio, como meio HAT. Entre estas, linhagens celulares de mieloma preferidas são as linhagens de mieloma murino, como aquelas derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis por meio do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, EUA, e SP-2 ou células X63-Ag8-653 disponíveis por meio da Coleção Americana de Tipos de Cultura, Rockville, Maryland, EUA. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano de camundongos também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova York, 1987)).

O meio de cultura no qual as células estão crescendo é avaliado para produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra, por exemplo, VEGF, Gr1, elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, CD11b, CD18, um URCGP, um DRCGP, um URRTP ou um DR RTP, ou uma molécula de angiogênese. A especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma pode ser determinada por imunoprecipitação ou por um teste de ligação *in vitro*, como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA). Tais técnicas e testes são conhecidos. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise *Scatchard* de Munson e Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Após células de hibridoma serem identificadas para produção de anticorpos com especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitantes e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). O meio de cultura adequado para este propósito inclui, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascite em um animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro, por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais, como por exemplo, proteína A Sefarose, cromatografia sobre hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálises ou cromatografia de afinidade. Os anticorpos monoclonais também podem ser feitos por métodos de DNA recombinante, como aqueles descritos na patente US 4.816.567. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado usando-se procedimentos convencionais (por exemplo, pelo uso de sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias leves

e pesadas dos anticorpos monoclonais). As células de hibridoma servem como uma fonte de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que em seguida são transfectados em células hospedeiras, como células *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína da imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. A produção recombinante de anticorpos será descrita em maiores detalhes abaixo:

Em outra realização, anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados de bibliotecas de fagos de anticorpos, geradas com o uso de técnicas descritas em McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, usando-se bibliotecas de fago. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (variação de nM) por meio de mistura de cadeias (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como infecções combinatórias e recombinação *in vivo*, como estratégia para a construção de bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Dessa forma, essas técnicas são alternativas viáveis para técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O DNA também pode ser modificado, por exemplo, pela substituição das sequências de domínio constante das cadeias humanas leve e cadeia pesada, no lugar das sequências homólogas de murino (patente US 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), ou pela ligação covalente à sequência que codifica a imunoglobulina de toda ou parte da sequência codificadora para um polipeptídeo não-imunoglobulina.

Tipicamente, tais polipeptídeos não-imunoglobulina são

substituídos pelo domínio constante de um anticorpo, ou são substituídos pelo domínio variável de um sítio de combinação de um anticorpo, para criar um anticorpo bivalente quimérico que compreende um sítio de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno e outro sítio de combinação de antígeno que tem especificidade para um antígeno diferente.

ANTICORPOS HUMANIZADOS E HUMANOS

Anticorpos da invenção podem compreender anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. Um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos a partir de uma fonte não humana.

Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente chamados de resíduos "importados", que são tipicamente retirados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores ((Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), pela substituição de CDRs sequências CDR de roedores por sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (patente US 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e, possivelmente, alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humano, tanto leve como pesado, para serem usados na fabricação de anticorpos humanizados é muito importante para reduzir antigenicidade. De acordo com o método também conhecido como "melhor ajuste", a sequência de domínio variável de um anticorpo de roedor é selecionada em relação à biblioteca completa das

sequências de domínio variável humana conhecida. A sequência humana que é a mais próxima daquela do roedor é então aceita como a região de estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Outro método utiliza uma
5 região de estrutura específica derivada a partir da sequência consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico da cadeia leve ou pesada. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

10 É ainda importante que anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade para o antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com um método típico, anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais, usando-se
15 modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos tridimensionais da imunoglobulina estão comumente disponíveis e são familiares para aqueles técnicos no assunto. Programas de computador que ilustram e exibem possíveis estruturas de conformação tridimensional das sequências de imunoglobulina candidata selecionada estão disponíveis. A
20 inspeção destas exibições permite a análise do papel provável no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise de resíduos que influenciam na habilidade da imunoglobulina candidata se ligar ao seu antígeno. Desta maneira, resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir do receptor e de sequências importadas, de forma que as
25 características desejadas do anticorpo, como o aumento de afinidade para o(s) antígeno(s) alvo(s), sejam atingidas. Em geral, os resíduos CDR são diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antígeno.

Alternativamente, é agora possível se produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito

5 que a deleção homozigótica do gene (J_H) da região de ligação da cadeia pesada do anticorpo em camundongos mutantes e quiméricos de linhagem germinativa resulta na inibição completa da produção de anticorpo endógeno. A transferência do conjunto de gene de imunoglobulina da linhagem germinativa humana em tais linhagens germinativas de camundongo mutante resultará na

10 produção de anticorpos humanos, mediante desafio com antígeno. Ver, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993) e Duchosal *et al.* *Nature* 355, 258 (1992). Anticorpos humanos podem ser derivados de bibliotecas de exibição por fago

15 (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)); Vaughan *et al.* *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

Anticorpos humanos também podem ser produzidos usando-se várias técnicas conhecidas, incluindo bibliotecas de exibição por fago (Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*,

20 222:581 (1991)). De acordo com esta técnica, os genes do domínio V do anticorpo são clonados em quadro, tanto em um gene de proteína de revestimento maior como menor, de um bacteriófago filamentosos, como M13 ou fd, e exibidos na forma de fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentosa contém uma

25 cópia de DNA fita simples do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene que codifica o anticorpo que exhibe essas propriedades. Dessa forma, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição por fago pode ser realizada

em uma série de formatos; revisados em, por exemplo, Johnson, K.S. e Chiswell, David J., *Cur. Opin. in Struct. Biol.* 3:564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos de gene V podem ser utilizadas para exibição por fago. Por exemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) isolaram um conjunto

5 diverso de anticorpos anti-oxazolona a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V, derivados de baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para um conjunto diverso de antígenos (incluindo auto-antígenos) podem ser isolados, seguindo-se essencialmente as

10 técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) ou Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Ver, também, patentes US 5.565.332 e 5.573.905. As técnicas de Cole *et al.* e Boerner *et al.* estão também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985) e

15 Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)). Anticorpos humanos também podem ser gerados por células B ativadas *in vitro* (ver patentes US 5.567.610 e 5.229.275).

FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

Fragmentos de anticorpos estão também incluídos na invenção.

20 Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados via digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) e Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora

25 produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente a partir de *E. coli* e acoplados quimicamente para

formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)).

De acordo com outra abordagem, fragmentos $F(ab')_2$ podem ser isolados diretamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os

5 técnicos no assunto. Em outras realizações, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Ver documento WO 93/07378 , patente US 5.571.894 e patente US 5.587.458. Fv e sFv são os únicos tipos com sítios de combinação intactos desprovidos de regiões constantes, então, eles são adequados para ligação não específica reduzida durante o uso *in vivo*.

10 Proteínas de fusão sFv podem ser construídas para produzir fusão de uma proteína efetora, tanto na terminação amina como carboxila de um sFv. Ver *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, acima. Os fragmentos de anticorpos também podem ser um "anticorpo linear", por exemplo, descritos na patente US 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos de anticorpos lineares podem ser

15 monoespecíficos ou biespecíficos.

ANTICORPOS MULTIESPECÍFICOS (POR EXEMPLO, BIESPECÍFICOS)

Os anticorpos da invenção também incluem, por exemplo, anticorpos biespecíficos, que têm especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Enquanto tais moléculas normalmente se ligam

20 somente a dois antígenos (isto é, anticorpos biespecíficos, BsAbs), anticorpos com especificidades adicionais, como anticorpos triespecíficos, são incluídos por esta expressão, quando usados no presente pedido. Exemplos de BsAbs incluem aqueles com um braço dirigido contra um antígeno da célula tumoral e o outro braço dirigido contra uma molécula de acionamento citotóxico, anti-

25 FcγRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/FcγRIII (CD16), anti-CD3/anti-célula B maligna (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-célula de carcinoma renal, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de cólon), anti-CD3/anti-análogo de hormônio estimulante de melanócito, anti-

receptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adesão de célula neural (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de ligação de folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno associado a pan carcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs com um braço que se liga especificamente a uma toxina como anti-saporina/anti-Ig-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadeia A de ricina, anti-interferon- α (IFN- α)/antiidiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-alcalóide da vinca; BsAbs para pró-drogas ativadas por enzima de conversão como anti-CD30/anti-fosfatase alcalina (que catalisa conversão da pró-droga fosfato de mitomicina em miomicina); BsAbs que podem ser usados como agentes fibrinolíticos, como anti-fibrina/anti-ativador plasminogênico de tecido (uPA); BsAbs para atingir complexos imunes para receptores de superfície celular, como anti-lipoproteína de baixa densidade (LDL)/anti-receptor Fc (por exemplo, Fc γ RI, Fc γ RII ou Fc γ RIII); BsAbs para uso em terapia de doenças infecciosas como anti-CD3/anti-vírus herpes simplex (HSV), anti-receptor de célula T:complexo CD3/anti-influenza, anti-Fc γ R/anti-HIV; BsAbs para detecção de tumor *in vitro* ou *in vivo*, como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAbs adjuvantes de vacinas; e BsAbs como ferramentas diagnósticas como anti-IgG de coelho/anti-ferritina, anti-peroxidase de rábano silvestre (HRP)/anti-hormônio, anti-somatostatina/anti-substância P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti- β -galactosidase. Exemplos de anticorpos triespecíficos incluem: anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 e anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos completos ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab')₂).

Métodos de fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos completos é baseada na co-expressão de dois pares da cadeia leve e cadeia

pesada da imunoglobulina, onde as duas cadeias possuem especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Devido à escolha aleatória das cadeias leve e pesada da imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é normalmente realizada pelas etapas de cromatografia de afinidade, é um tanto problemática, e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são divulgados no documento WO 93/08829 e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação de anticorpos e antígenos) são fundidos às sequências de domínio constante da imunoglobulina. A fusão é, preferencialmente, com um domínio constante da cadeia pesada da imunoglobulina, que compreende pelo menos parte das regiões de dobradiça, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contendo o sítio necessário para a ligação de cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões da cadeia pesada da imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve da imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Isso fornece grande flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos do polipeptídeo em realizações onde razões desiguais das três cadeias do polipeptídeo utilizadas na construção fornecem o máximo de rendimento. É possível, no entanto, inserir sequências de codificação para duas ou todas as três cadeias de polipeptídeos em um único vetor de expressão, quando a expressão de pelo menos duas cadeias do polipeptídeo em razões iguais resulta em altos rendimentos ou quando as razões não são de significância específica.

Em uma realização desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos por uma cadeia pesada da imunoglobulina híbrida com a primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia leve e cadeia pesada da imunoglobulina híbrida (que fornece uma segunda
5 especificidade de ligação) no outro braço. Concluiu-se que essa estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico desejado das combinações de cadeia da imunoglobulina indesejadas, pois a presença da cadeia leve da imunoglobulina em apenas metade da molécula biespecífica fornece uma maneira fácil de separação. Esta abordagem está descrita no
10 documento WO 94/04690. Para maiores detalhes de geração de anticorpos biespecíficos, ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita no documento WO 96/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser
15 modificada geneticamente para maximizar a porcentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura de células recombinantes. A interface preferida compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante do anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenos da interface da primeira molécula do anticorpo são substituídas por
20 cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas sobre a interface da segunda molécula de anticorpo, pela substituição de grandes cadeias laterais de aminoácidos por cadeias menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isso fornece um mecanismo de aumento
25 de produção do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, como homodímeros.

As técnicas para geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Por exemplo,

anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando-se ligações químicas. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) descreve um procedimento em que anticorpos intactos são clivados proteolicamente para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante ditiol
5 arsenato de sódio para estabilizar ditióis próximos e prevenir formação de bissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados do Fab' -TNB é então reconvertido em Fab' -tiol por redução com mercaptoetilamina e é
10 misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado do Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Recente progresso facilitou a recuperação direta de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)
15 descreve a produção de uma molécula do anticorpo $F(ab')_2$ biespecífico humanizado em sua totalidade. Cada fragmento Fab' foi secretado separadamente de *E. coli* e sujeito ao acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado
foi capaz de se ligar a células que superexpressam o receptor do VEGF e
20 células T humanas normais, bem como acionar a atividade lítica dos linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humanos.

Diversas técnicas de fabricação e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos, diretamente a partir de cultura celular recombinante também foram descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram
25 produzidos usando-se zíper de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Os peptídeos do zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão genética. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de

dobradiça para formarem monômeros e então reoxidados para formarem os heterodímeros do anticorpo. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros do anticorpo. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo para fabricação de fragmentos de anticorpos 5 biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável da cadeia leve (V_L) por um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são 10 forçados a parear com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, através disto, formando dois sítios de ligação de antígenos. Outra estratégia para fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos pelo uso de dímeros Fv de cadeia única (sFv) também foi relatada. Ver Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

15 Anticorpos com mais de duas valências são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

ANTICORPOS HETEROCONJUGADOS

Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou 20 "heteroconjugados", que são anticorpos da invenção. Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado à avidina e o outro à biotina. Tais anticorpos, por exemplo, foram propostos para atingir células do sistema imunológico a células indesejadas (patente US 4.676.980), e para o tratamento de infecções por HIV (documento WO 91/00360, documento WO 92/200373 e 25 patente EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser fabricados usando-se qualquer método de reticulação conveniente. Os agentes de reticulação adequados são bem conhecidos na técnica e estão divulgados na patente US 4.676.980, juntamente com uma série de técnicas de reticulação.

ANTICORPOS MULTIVALENTES

Anticorpos da invenção incluem um anticorpo multivalente. Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rápido do que um anticorpo bivalente por uma célula que expressa um antígeno ao qual os anticorpos se ligam. Os anticorpos da invenção podem ser anticorpos multivalentes (exceto da classe IgM) com três ou mais sítios de ligação de antígeno (por exemplo, anticorpos tetravalentes), que podem ser facilmente produzidos por expressão recombinante de ácido nucléico que codifica as cadeias polipeptídicas do anticorpo. O anticorpo multivalente pode compreender um domínio de dimerização e três ou mais sítios de ligação ao antígeno. O domínio de dimerização preferido compreende (ou consiste de) uma região Fc ou uma região de dobradiça. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc e três ou mais sítios de ligação de antígeno amino-terminal para a região Fc. O anticorpo multivalente preferido no presente pedido compreende de (ou consiste de) três a cerca de oito, mais preferencialmente, quatro sítios de ligação de antígeno. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia polipeptídica (e preferencialmente duas cadeias polipeptídicas), em que a(s) cadeia(s) polipeptídica(s) compreende(m) dois ou mais domínios variáveis. Por exemplo, a cadeia(s) polipeptídica(s) pode(m) compreender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, sendo que VD1 é um primeiro domínio variável, VD2 é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc, X1 e X2 representam um aminoácido ou polipeptídeo, e n é 0 ou 1. Por exemplo, a cadeia polipeptídica pode compreender: VH-CH1-ligante flexível-VH-CH1-cadeia da região Fc; ou VH-CH1-VH-CH1-cadeia da região Fc. O anticorpo multivalente preferido no presente pedido, além disso, compreende pelo menos dois (e preferencialmente quatro) polipeptídeos do domínio variável da cadeia leve. O anticorpo multivalente no presente pedido pode, por exemplo, compreender

cerca de dois a oito polipeptídeos do domínio variável da cadeia leve. Os polipeptídeos do domínio variável da cadeia leve, aqui contemplados, compreendem um domínio variável da cadeia leve e, opcionalmente, também compreendem um domínio CL.

5

ENGENHARIA DE FUNÇÃO EFETORA

Pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção com respeito à função efetora, para aumentar, por exemplo, a eficácia do anticorpo no tratamento de câncer. Por exemplo, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, através disso, permitindo formação de ponte bissulfeto entre cadeias nesta
 10 região. O anticorpo homodimérico gerado dessa forma pode ter aprimorado a capacidade de internalização e/ou aumento de morte celular mediada por complemento e citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC). Ver Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) e Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com aumento de atividade anti-
 -15 tumor também podem ser preparados usando-se interligantes heterobifuncionais como descrito em Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo que possui regiões Fc duplas pode ser modificado e pode, através disso, ter aumento de capacidades de lise de complemento e de ADCC. Ver Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989). Para
 20 aumentar a meia vida do soro do anticorpo, pode-se incorporar um epitopo de ligação do receptor de resgate no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) como descrito na patente US 5.739.277, por exemplo. 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)
 25 que é responsável por aumentar *in vivo* a meia vida de soro da molécula de IgG.

IMUNOCONJUGADOS

A invenção também se relaciona a imunoconjugados que compreendem o anticorpo descrito no presente pedido, conjugado a um agente

citotóxico, como um agente quimioterápico, toxina (por exemplo, uma toxina ativa enzimaticamente de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destas), ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado). Uma variedade de radionuclídeos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem, mas não se limitam a ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re .

Agentes quimioterápicos úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima. Por exemplo, BCNU, estreptozoicina, vincristina, 5-flúor uracil, a família de agentes, conhecida coletivamente como complexo LL-E33288, descrita nas patentes US 5.053.394, 5.770.710, esperamicinas (patente US 5.877.296), etc. (ver também a definição de agentes quimioterápicos no presente pedido), podem ser conjugados a anticorpos da invenção ou fragmentos destes.

Para destruição seletiva do tumor, o anticorpo pode compreender um átomo altamente radioativo. Uma variedade de isótopos radioativos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados ou fragmentos destes. Exemplos incluem, mas não se limitam a, por exemplo, ^{212}Bi , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb , ^{111}In , isótopos radioativos de Lu, etc. Quando a conjugação é usada para diagnóstico, pode compreender um átomo radioativo para estudos cintigráficos, por exemplo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{123}I , ou um marcador *spin* para imagem de ressonância nuclear (NMR) (também conhecido como imagem de ressonância magnética, mri), como iodo-123, iodo-131, índio-111, flúor-19, carbono-13, nitrogênio-15, oxigênio-17, gadolínio, manganês ou ferro.

O rádio ou outros marcadores podem ser incorporados no conjugado de um modo conhecido. Por exemplo, o peptídeo pode ser biosintetizado, ou pode ser sintetizado por síntese química de aminoácido usando-se aminoácidos precursores adequados envolvendo, por exemplo,

flúor-19 no lugar de hidrogênio. Marcadores como ^{99m}Tc ou ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re e ^{111}In podem ser ligados via um resíduo de cisteína no peptídeo. Ítrio-90 pode ser ligados via um resíduo de lisina. O método IODOGEN (Fraker *et al* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 4957 pode ser usado para incorporar

5 iodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) descreve outros métodos em detalhes.

Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser usadas incluem cadeia A da difteria, fragmentos ativos não ligantes de toxina de difteria, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia

10 A da ricina, cadeia A da abrina, cadeia A da modicina, alfa-sarcina, proteína de *Aleurites fordii*, proteínas da diantina, proteínas da *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor carantia momordica, curcina, crotina, inibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, neomicina e os tricotecnos. Ver, por exemplo, documento WO 93/21232 publicado em

-15 28 de outubro de 1993.

Conjugados de anticorpo e agente citotóxico são feitos usando-se uma variedade de agentes de acoplamento de proteína de bifuncionais, como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados de

20 imidoésteres bifuncionais (como dimetil adipimidato HCl), ésteres ativos (tal como disuccinimidil suberato), aldeídos (como glutaraldeído), combinados de bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazônio (como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato), e bis-ativo flúor combinados (tal como 1,5-diflúor-2,4-

25 dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al. Science* 238: 1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triamino penta acético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um agente quelante exemplar para conjugação de

radionucleotídeo ao anticorpo. Ver documento WO 94/11026. O ligante pode ser um "ligante clivável" que facilita a liberação da droga citotóxica na célula. Por exemplo, pode ser usado um ligante ácido lábil, ligante sensível à peptidase, ligante fotolábil, ligante dimetil ou ligante que contém bissulfeto (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127131 (1992); patente US 5.208.020).

Alternativamente, uma proteína de fusão que compreende o anticorpo anti-VEGF e/ou anti-proteína e agente citotóxico podem ser fabricados, por exemplo, por técnicas recombinantes ou síntese de peptídeo. O comprimento do DNA pode compreender regiões respectivas que codificam as duas porções do conjugado, tanto adjacentes uma à outra como separadas por uma região que codifica um peptídeo ligante que não anula as propriedades desejadas do conjugado.

Em certas realizações, o anticorpo é conjugado a um "receptor" (como estreptavidina) para utilização no tumor pré-direcionado, em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido pela remoção de conjugado não ligado da circulação, usando-se um agente de limpeza e então administração de um "ligante" (por exemplo, avidina) que é conjugada a um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleotídeo). Em certas realizações, um imunoconjugado é formado entre um anticorpo e um composto com atividade nucleolítica (por exemplo, uma ribonuclease ou uma DNA endonuclease, como uma desoxirribonuclease; DNase).

MAITANSINA E MAITANSINÓIDES

A invenção fornece um anticorpo da invenção, que é imunoconjugado a uma ou mais moléculas de maitansinóides. Maitansinóides são inibidores mitóticos que agem pela inibição da polimerização de tubulina. A maitansina foi isolada pela primeira vez do arbusto do Leste Africano *Maytenus serrata* (patente US 3.896.111). Subsequentemente, foi descoberto que certos micróbios também produzem maitansinóides, como maitansinol e

ésteres de maitansinol C-3 (patente US 4.151.042). Maitansinol sintético e derivados, e análogos destes, estão divulgados, por exemplo, nas patentes US 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4.260.608, 4.265.814, 4.294.757, 4.307.016, 4.308.268, 4.308.269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663 e 4.371.533.

Um anticorpo da invenção pode ser conjugado a uma molécula de maitansinóide, sem diminuição significativa da atividade biológica tanto do anticorpo como da molécula de maitansinóide. Uma média de 34 moléculas de maitansinóide conjugadas por molécula de anticorpo mostrou eficácia no aumento da citotoxicidade das células alvo, sem afetar negativamente a função ou a solubilidade do anticorpo, no entanto, seria esperado que até uma molécula de toxina/anticorpo aumentasse a citotoxicidade acima daquela do anticorpo nu. Maitansinóides são bem conhecidos na técnica e podem ser sintetizados por técnicas conhecidas ou isolados a partir de fontes naturais. Maitansinóides adequados são divulgados, por exemplo, na patente US 5.208.020 e em outras patentes e publicações não patente mencionadas acima. Em uma realização, maitansinóides preferidos são maitansinol e análogos do maitansinol, modificados no anel aromático ou em outras posições da molécula de maitansinol, como vários ésteres de maitansinol.

Existem muitos grupos de ligação conhecidos na técnica para fazer conjugações anticorpo-maitansinóides, incluindo, por exemplo, aqueles divulgados na patente US 5.208.020 ou na patente EP 0 425 235 B1, e Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992). Os grupos de ligação incluem grupos bissulfeto, grupos tioéter, grupos de ácido lábil, grupos fotolábil, grupos lábil peptidase ou grupos lábil esterase, como divulgado nas patentes acima identificadas, grupos bissulfeto e tioéter sendo preferidos.

Conjugados do anticorpo e maitansinóide podem ser feitos usando-se uma variedade de agentes de acoplamento de proteína de

bifuncionais tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados de imidoésteres bifuncionais (tal como dimetil adipimidato HCl), ésteres ativos (tal como disuccinimidil suberato), aldeídos (tal como glutaraldeído), bis-azido combinados (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazônio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), e bis-ativo flúor combinados (tal como 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzeno). Agentes de acoplamento tipicamente incluem N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) e N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), para fornecer uma ponte bissulfeto.

O ligante pode ser ligado à molécula de maitansinóide em várias posições, dependendo do tipo de ligação. Por exemplo, uma ligação éster pode ser formada por reação com um grupo hidroxila, usando-se técnicas convencionais de acoplamento. A reação pode ocorrer na posição C-3 tendo um grupo hidroxila, na posição C-14 modificada com hidroximetil, na posição C-15 modificada com um grupo hidroxila, e na posição C-20 tendo um grupo hidroxila. A ligação é formada na posição C-3 do maitansinol ou em um análogo do maitansinol.

CALIQUEAMICINA

Outro imunoc conjugado de interesse compreende um anticorpo da invenção conjugado a uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família de antibióticos caliqueamicina é capaz de produzir quebra da fita dupla de DNA em concentrações sub-picomolares. Para a preparação de conjugados da família caliqueamicina, ver patentes US 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas concedidas à American Cyanamid Company). Estruturas análogas de caliqueamicina que podem ser usadas incluem, mas não se limitam a γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG

e θ_1 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53:33363342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58:29252928 (1998) e as patentes US supracitadas, concedidas à American Cyanamid). Outra droga anti-tumor com a qual o anticorpo pode ser conjugado é QFA, que é um antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA têm
5 sítios intracelulares de ação e não atravessam de imediato a membrana plasmática. Então, a percepção celular destes agentes através da internalização mediada pelo anticorpo aumenta muito seus efeitos citotóxicos.

OUTRAS MODIFICAÇÕES DO ANTICORPO

Outras modificações do anticorpo estão contempladas no
10 presente pedido. Por exemplo, o anticorpo pode ser ligado a uma variedade de polímeros não proteínicos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol. O anticorpo também pode ser colocado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de acumulação ou por polimerização interfacial (por
15 exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), em 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* 16ª edição, Oslo, A., Ed.,
20 (1980).

LIPOSSOMOS E NANOPARTÍCULAS

Os polipeptídeos da invenção podem ser formulados em lipossomos. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser formulados como imunolipossomos. Lipossomos contendo o anticorpo são preparados por
25 métodos conhecidos na técnica, como descrito em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980) e patentes US 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomos com aumento no tempo de circulação estão divulgados na patente US 5.013.556.

Geralmente, a formulação e uso de lipossomos são conhecidos pelos técnicos no assunto.

Lipossomos particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídeo que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Lipossomos são retirados através de filtros com tamanho de poro definido, para produzir lipossomos com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do anticorpo da invenção podem ser conjugados aos lipossomos, como descrito em Martin *et al. J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) através de uma reação de intercâmbio de bissulfeto. Um agente quimioterápico (tal como Doxorubicina) é opcionalmente contido no interior do lipossomo. Ver Gabizon *et al. J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

OUTROS USOS

Os anticorpos da invenção têm várias utilidades. Por exemplo, anticorpos da invenção podem ser usados em testes diagnósticos, por exemplo, para detecção da expressão de proteínas em células específicas, tecidos ou soro, para detecção de câncer (por exemplo, na detecção de tumores resistentes), etc. Em uma realização, anticorpos são usados para selecionar a população de pacientes para tratamento com métodos fornecidos, por exemplo, para detectar pacientes com expressão alterada de Gr1, uma elastase de neutrófilo, MCP-1, MIP-1 alfa, URCGP, DRCGP, URRTP ou DRRTTP. Várias técnicas para testes diagnósticos conhecidos podem ser usadas, como testes de ligação competitiva, testes sanduíche diretos ou indiretos e testes de imunoprecipitação conduzidos tanto nas fases heterogêneas como homogêneas (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987) páginas 147-158). Os anticorpos usados nos testes diagnósticos podem ser marcados com um componente detectável. O componente detectável seria capaz de produzir, tanto diretamente como

indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, o componente detectável pode ser um radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ou ^{125}I , um composto fluorescente ou quimioluminescente, como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina, ou uma enzima, como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano silvestre. Qualquer método conhecido na técnica para conjugação do anticorpo ao componente detectável pode ser empregado, incluindo aqueles métodos descritos por Hunter *et al.*, *Nature*, 144:945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981) e Nygren, *J. Histochem. And Cytochem.*, 30:407 (1982).

Anticorpos da invenção também são úteis para a purificação da afinidade da proteína ou fragmento de uma proteína da invenção, a partir de cultura celular recombinante ou fontes naturais. Neste processo, os anticorpos contra a proteína são imobilizados em um suporte adequado, como resina Sephadex ou filtro de papel, usando-se métodos bem conhecidos na técnica. O anticorpo imobilizado é então contatado com uma amostra contendo a proteína a ser purificada e, posteriormente, o suporte é lavado com um solvente adequado que removerá substancialmente todo o material da amostra, exceto a proteína a ser purificada, que é ligado ao anticorpo imobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado, que irá liberar a proteína do anticorpo.

MODIFICAÇÕES COVALENTES PARA POLIPEPTÍDEOS DA INVENÇÃO

Modificações covalentes de um polipeptídeo da invenção, por exemplo, uma proteína da invenção, um anticorpo de uma proteína da invenção, um fragmento antagonista do polipeptídeo, uma molécula de fusão (por exemplo, uma molécula de imunofusão), etc., estão incluídos dentro do escopo desta invenção. Eles podem ser feitos por síntese química, por clivagem enzimática ou química do polipeptídeo, se aplicável. Outros tipos de

modificações covalentes do polipeptídeo são introduzidas na molécula por reação de resíduos de aminoácidos alvo do polipeptídeo com um agente de derivação, que é capaz de reagir com as cadeias laterais ou resíduos N ou C terminais selecionados, ou pela incorporação de um aminoácido modificado ou aminoácido não natural na cadeia polipeptídica em crescimento, por exemplo, Ellman *et al. Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991); Noren *et al. Science* 244:182 (1989); e publicações de pedidos de patente US 20030108885 e 20030082575.

Resíduos cisteinil, frequentemente, reagem com α -haloacetatos (e aminas correspondentes), como ácido cloroacético ou cloroacetamida, para fornecer derivados carboximetil ou carboxiamidometil. Resíduos cisteinil também são derivados pela reação com bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoi)propiónico, cloroacetil fosfato, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil bissulfeto, metil 2-piridil bissulfeto, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol ou cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazola.

Resíduos de histidina são derivados pela reação com dietilpirocarbonato em pH 5,5-7,0, porque este agente é relativamente específico para a cadeia lateral de histidil. Para-bromofenacil brometo também é útil, a reação é tipicamente realizada em 0,1 M de cacodilato de sódio em pH 6,0.

Lisinil e resíuos amino-terminais reagem com anidridos de ácido carboxílico ou succínico. A derivação com estes agentes possui efeito de reverter a carga dos resíduos lisinil. Outros reagentes adequados para derivação de resíduos que contêm α -amino incluem imidoésteres, como metil picolinimidato, piridoxal fosfato, piridoxal, cloroborohidreto, ácido trinitrobenzenosulfônico, O-metilisouréia, 2,4-pentanediona e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

Resíduos arginil são modificados pela reação com um dos diversos reagentes convencionais, entre eles fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-

ciclohexanodiona e ninidrina. A derivação de resíduos de arginina exige que a reação seja realizada em condições alcalinas devido ao alto pK_a do grupo funcional guanidina. Além disso, estes reagentes podem reagir com os grupos da lisina como também o grupo arginina épsilon-amino.

5 A modificação específica de resíduos tirosil pode ser feita, com interesse específico na introdução de marcas espectrais nos resíduos tirosil pela reação com compostos aromáticos diazônio ou tetranitrometano. Mais comumente, N-acetilimidizola e tetranitrometano são usados para formar espécies O-acetil tirosil e derivados 3-nitro, respectivamente. Resíduos tirosil
10 são tratados com iodo usando-se ^{125}I ou ^{131}I para preparar proteínas marcadas para uso em radioimunoensaio.

Grupos laterais carboxil (aspartil ou glutamil) são seletivamente modificados pela reação com carbodiimidas ($\text{R-N}=\text{C}=\text{N-R}'$), onde R e R' são diferentes grupos alquil, como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida ou
15 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Além disso, resíduos aspartil e glutamil são convertidos para resíduos asparaginil e glutaminil pela reação com íons amônio.

Resíduos glutaminil e asparaginil são frequentemente deamidados para os resíduos glutamil e aspartil correspondentes,
20 respectivamente. Estes resíduos são deamidados sob condições neutras ou básicas. A forma deamidada destes resíduos esta incluída dentro do escopo desta invenção.

Outras modificações incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxil de resíduos seril ou treonil, metilação dos grupos
25 α -amino de lisina, arginina e cadeias laterais de histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., São Francisco, páginas 79-86 (1983)), acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxila C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente envolve glicosídeos acoplados, quimicamente ou enzimaticamente, a um polipeptídeo da invenção. Estes procedimentos são vantajosos já que eles não necessitam de produção do polipeptídeo em uma célula hospedeira que possui capacidades de glicosilação para glicosilação N ou O-ligadas. Dependendo do modo de acoplamento usado, o(s) açúcar(es) pode ou podem ser ligados a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxila livres, (c) grupos sulfidril livres, como aqueles de cisteína, (d) grupos hidroxila livres, como aqueles de serina, treonina ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos, como aqueles de fenilalanina, tirosina ou triptofano, ou (f) o grupo amida de glutamina. Estes métodos estão descritos no documento WO 87/05330 publicado em 11 de setembro de 1987 e em Aplin e Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, páginas. 259-306 (1981).

A remoção de qualquer componente carboidrato presente em um polipeptídeo da invenção pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente. Deglicosilação química requer exposição do polipeptídeo ao composto ácido trifluormetanosulfônico, ou um composto equivalente. Este tratamento resulta na clivagem da maioria ou de todos os açúcares, exceto a ligação de açúcar (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), e ao mesmo tempo deixando o polipeptídeo intacto. Deglicosilação química está descrita por Hakimuddin, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) e por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). A clivagem enzimática de componentes carboidratos, por exemplo, nos anticorpos, pode ser alcançada pelo uso de uma variedade de endo e exoglicosidases, como descrito por Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente de um polipeptídeo da invenção compreende ligação do polipeptídeo a uma variedade de polímeros não proteínicos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol, ou polioxialquilenos, das formas apresentadas nas patentes US 4.640.835,

4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 ou 4.179.337.

VETORES, CÉLULAS HOSPEDEIRAS E MÉTODOS RECOMBINANTES

Os polipeptídeos da invenção podem ser produzidos de forma recombinante, usando-se técnicas e materiais facilmente obtidos.

5 Para produção recombinante de um polipeptídeo da invenção, por exemplo, uma proteína da invenção, um anticorpo de uma proteína da invenção, por exemplo, anticorpo anti-VEGF o ácido nucléico que os codifica é isolado e inserido em um vetor replicante para posterior clonagem (amplificação do DNA) ou para expressão. O DNA que codifica o polipeptídeo
10 da invenção é facilmente isolado e sequenciado, usando-se procedimentos convencionais. O DNA que codifica o anticorpo monoclonal é isolado e sequenciado, por exemplo, pelo uso de sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias leves e pesadas do anticorpo. Muitos vetores estão disponíveis. Os componentes
15 do vetor geralmente incluem, mas não se limitam a um ou mais dos seguintes: uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento *enhancer*, um promotor e uma sequência de terminação de transcrição.

COMPONENTE SEQUÊNCIA SINAL

20 Polipeptídeos da invenção podem ser produzidos de forma recombinante não somente diretamente, mas também como uma fusão do polipeptídeo com um polipeptídeo heterólogo, que pode ser uma sequência sinal ou outro polipeptídeo que possui um sítio de clivagem específico no N-terminal da proteína ou polipeptídeo maduro. A sequência sinal heteróloga
25 selecionada, tipicamente, é aquela reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procariontes que não reconhecem e não processam a sequência sinal do polipeptídeo, a sequência sinal é substituída por uma sequência sinal

selecionada de procarionte, por exemplo, do grupo da fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou líderes enterotoxina II estáveis ao calor. Para secreção em levedura, a sequência sinal nativa pode ser substituída, por exemplo, por um líder invertase da levedura, líder fator α (incluindo *Saccharomyces* e líderes fator α *Kluyveromyces*), ou líder fosfatase ácida, o líder glucoamilase *C. albicans*, ou o sinal descrito no documento WO 90/13646. Na expressão em células de mamíferos, a sequência sinal de mamíferos, bem como líderes secretórios virais, por exemplo, o sinal gD de *herpes simplex*, estão disponíveis.

O DNA para tal região precursora é ligado no quadro de leitura para o DNA que codifica o polipeptídeo da invenção.

COMPONENTE ORIGEM DE REPLICAÇÃO

Ambos, vetores de expressão e vetores de clonagem contêm uma sequência de ácido nucléico que permite a replicação do vetor em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Geralmente, em vetores de clonagem, esta sequência é aquela que permite a replicação do vetor independentemente do DNA cromossômico do hospedeiro, e inclui origens de replicação ou sequências replicantes independentes. Tais sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem da replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 μ é adequada para levedura, e várias origens virais (SV40, políoma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vetores de clonagem em células de mamíferos. Geralmente, o componente origem de replicação não é necessário para vetores de expressão de mamíferos (a origem SV40 pode, tipicamente, ser usada somente porque esta contém o promotor inicial).

SELEÇÃO DO COMPONENTE GENE

Vetores de expressão e clonagem podem conter um gene de seleção, também chamado de marcador selecionável. A seleção típica de

genes codifica proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) suprem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, por exemplo, o gene que codifica D-alanina racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de um esquema de seleção utiliza uma droga para interromper o crescimento de uma célula hospedeira. Essas células, que são sucessivamente transformadas com um gene heterólogo, produzem uma proteína que confere resistência à droga e, dessa forma, sobrevivem ao regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante usam as drogas neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Outro exemplo de marcadores de seleção adequados para as células de mamíferos são aqueles capazes de identificar células competentes para ocupar o ácido nucléico do anticorpo, como DHFR, timidina quinase, metalotioneína-I e II, tipicamente, genes da metalotioneína de primatas, adenosina deaminase, ornitina decarboxilase, etc.

Por exemplo, células transformadas com o gene de seleção DHFR são as primeiras identificadas pela cultura de todos os transformantes em um meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Uma célula hospedeira apropriada quando DHFR tipo selvagem é empregado é a linhagem celular ovariana de hamster Chinês (CHO), deficiente na atividade de DHFR.

Alternativamente, células hospedeiras (particularmente hospedeiros tipo selvagem que contém DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de DNA que codificam um polipeptídeo da invenção, proteína DHFR tipo selvagem, e outro marcador selecionável, como aminoglicosídeo 3'-fosfotransferase (APH), podem ser selecionadas pelo crescimento celular em um meio que contém um agente de seleção para o

marcador selecionável, como um antibiótico aminoglicosídico, por exemplo, canamicina, neomicina ou G418. Ver patente US 4.965.199.

Uma gene de seleção adequado para uso em leveduras é o gene *trp1*, presente no plasmídio de levedura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). O gene *trp1* fornece um marcador de seleção para uma linhagem mutante desprovida da habilidade de crescimento em triptofano, por exemplo, ATCC No. 44076 ou PEP4-1 Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). A presença da lesão *trp1* no genoma da célula hospedeira de levedura então fornece um ambiente efetivo para detecção da transformação pelo crescimento na ausência de triptofano. De maneira similar, linhagens de levedura deficientes em Leu2 (ATCC 20.622 ou 38.626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que produzem o gene Leu2.

Além disso, vetores derivados do plasmídeo pKD1 circular de 1,6 μ m podem ser usados para transformação de leveduras *Kluyveromyces*.

Alternativamente, um sistema de expressão para produção em grande escala de bezerro chymosin foi relatado por *K.lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Vetores de expressão multi cópias, estáveis para secreção de albumina do soro humano recombinante madura por linhagens industriais de *Kluyveromyces*, foram também divulgados. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

COMPONENTE PROMOTOR

Vetores de expressão e clonagem usualmente contêm um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operacionalmente ligado ao ácido nucléico que codifica um polipeptídeo da invenção. Promotores adequados para o uso em hospedeiros procariontes incluem o promotor *phoA*, β -lactamase e os sistemas promotores lactose, fosfatase alcalina, um sistema promotor triptofano (*trp*) e promotores híbridos, como o promotor *tac*. No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos

são adequados. Promotores para uso em sistemas bacterianos também irão conter uma sequência Shine-Dalgarno (S.D) operacionalmente ligada ao DNA que codifica o polipeptídeo da invenção.

Sequências promotoras são conhecidas para eucariontes.

- 5 Virtualmente, todos os genes eucariontes têm uma região rica em AT, localizada cerca de 25 a 30 bases a montante do sítio onde a transcrição é iniciada. Outra sequência encontrada de 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é uma região CNCAAT onde N pode ser qualquer nucleotídeo. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucariontes
- 10 está uma sequência AATAAA, que pode ser o sinal para adição da cauda poli A à extremidade 3' da sequência codificadora. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vetores de expressão de eucariontes.

- Exemplos de sequências promotoras adequadas para uso em leveduras hospedeiras incluem os promotores para 3-fosfoglicerato quinase ou
- 15 outras enzimas glicolíticas, como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, triosefosfato isomerase, fosfoglicose isomerase e glicoquinase.

- Outros promotores de levedura, que são promotores induzíveis
- 20 que possuem vantagens adicionais de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões promotoras para álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativa associada ao metabolismo do nitrogênio, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose . Vetores e promotores
- 25 adequados para uso na expressão em levedura estão também descritos na patente EP 73.657. *Enhancers* de levedura usados com promotores de levedura são também vantajosos.

A transcrição de polipeptídeos da invenção a partir de vetores em

células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos de genomas de vírus, como vírus políoma, vírus fowlpox, adenovírus (tal como Adenovirus 2), vírus de papiloma bovino, vírus de sarcoma de aves, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite-B e vírus Simian 40 (SV40),
 5 promotores heterólogos de mamíferos, por exemplo, o promotor actina ou um promotor imunoglobulina, promotores de choque térmico, tais promotores fornecidos são compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

Os promotores iniciais e finais do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição SV40, que também
 10 contém a origem de replicação viral SV40. O promotor inicial imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição HindIII E. Um sistema para expressão de DNA em mamíferos hospedeiros, usando-se o vírus de papiloma bovino como um vetor, é divulgado na patente US 4.419.446. A modificação deste sistema está descrita
 15 na patente US 4.601.978. Ver também Reyes *et al.*, Nature 297:598-601 (1982) na expressão de cDNA de β -interferon humano em células de camundongo sob o controle de um promotor timidina quinase de vírus *herpes simplex*. Alternativamente, a repetição da terminação longa do vírus do sarcoma de Rous pode ser usada como promotor.

20 COMPONENTE ELEMENTO ENHANCER

A transcrição de um DNA que codifica um polipeptídeo desta invenção por eucariontes mais evoluídos é frequentemente aumentada pela inserção de uma sequência *enhancer* no vetor. Muitas sequências *enhancer* de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina) são
 25 agora conhecidas. Tipicamente, poderá ser usado um *enhancer* de um vírus de célula eucarionte. Exemplos incluem o *enhancer* SV40 no último lado da origem de replicação (bp 100-270), o *enhancer* do promotor inicial do citomegalovírus, o *enhancer* do políoma no último lado da origem de replicação

e *enhancers* de adenovírus. Ver também Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) nos elementos *enhancing* para ativação de promotores de eucariontes. O *enhancer* pode ser ligado no vetor na posição 5' ou 3' para a sequência codificadora do polipeptídeo, mas está geralmente localizado em um sítio 5' do promotor.

5

COMPONENTE TERMINAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

Vetores de expressão usados em célula hospedeiras eucariontes (leveduras, fungos, insetos, vegetais, animais, humanas ou células nucleadas de outros organismos multicelulares) irão também conter sequências necessárias para a terminação de transcrição e para estabilização do mRNA.

10

Tais sequências estão comumente disponíveis nas regiões não traduzidas de eucariontes 5' e, ocasionalmente 3', ou DNAs ou cDNAs virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleotídeo transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do mRNA que codifica o polipeptídeo da invenção. Um componente da terminação de transcrição útil é a região de poliadenilação do

15

hormônio de crescimento bovino. Ver documento WO 94/11026 e o vetor de expressão divulgado no presente pedido.

SELEÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão de DNA que codifica os polipeptídeos da invenção, nos vetores no presente

20

pedido, incluem células procariontes, leveduras ou eucariontes superiores descritos acima. Procariontes adequados para este propósito incluem eubactérias, como organismos Gram-negativo ou Gram-positivo, por exemplo, Enterobacteriaceae, como *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por exemplo., *Serratia marcescans* e *Shigella*, bem como *Bacilli*, como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P divulgadas em DD 266.710 publicado em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa* e *Streptomyces*. Tipicamente, o

25

hospedeiro *E. coli* para clonagem é *E. coli* 294 (ATCC 31.446), embora outras linhagens, como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) sejam adequadas. Estes exemplos são mais ilustrativos do que limitantes.

5 Além de procariontes, micróbios eucariontes, como fungo filamentoso ou levedura são hospedeiros para clonagem ou expressão adequados para vetores que codificam polipeptídeos da invenção. *Saccharomyces cerevisiae*, ou fermento comum de padaria, é o mais comumente usado entre os microorganismos hospedeiros eucariontes

10 inferiores. No entanto, uma variedade de outros gêneros, espécies e linhagens estão comumente disponíveis e são úteis no presente pedido, como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedeiros *Kluyveromyces* como, por exemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K.*

15 *thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, como *Schwanniomyces occidentalis* e fungos filamentosos como, por exemplo, hospedeiros *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* e *Aspergillus*, como *A. nidulans* e *A. Niger*.

20 Células hospedeiras adequadas para a expressão de polipeptídeos glicosilados da invenção são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células vegetais e de insetos. Muitas linhagens de baculovírus e variantes, e células hospedeiras de inseto permissivas correspondentes de hospedeiros como

25 *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori* foram identificadas. Uma variedade de linhagens virais para transfecção está publicamente disponível, por exemplo, variante L-1 de *Autographa californica*

NPV e linhagem Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais vírus podem ser usados como o vírus no presente pedido de acordo com a invenção, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*. Culturas de células vegetais de algodão, milho, soja, petúnia, tomate e tabaco também podem ser utilizadas como hospedeiros.

No entanto, o interesse em células de vertebrados tem aumentado, e a propagação de células na cultura (cultura de tecido) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens celulares hospedeiras de mamíferos úteis são as linhagens CV1 de rim de macaco transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)) células de rim de filhotes de hamster (BHK, ATCC CCL 10), células ovarianas de hamster Chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)), células de sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)), células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70), células de rim de macaco verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humana (HELA, ATCC CCL 2), células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34), células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75), células de fígado humano (Hep G2, HB 8065), tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)), células MRC 5, células FS4 e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

Células hospedeiras são transformadas com os vetores de expressão ou clonagem descritos acima, para produção do polipeptídeo da invenção e cultivadas em meio convencional de nutriente modificado, como apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes ou amplificar os genes que codificam as sequências desejadas.

CULTURA DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As células hospedeiras usadas para produzir polipeptídeos da invenção podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio Modificado de Eagle de Dulbecco ((DMEM), Sigma) são adequados para cultivar as células hospedeiras. Além disso, qualquer um dos meios descritos em Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem.102:255 (1980), patentes US 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 ou 5.122.469; documentos WO 90/03430, WO 87/00195 ou patente US Re. 30.985 podem ser usados como meios de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado, conforme necessário, com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (como insulina, transferrina ou fator de crescimento epidermal), sais (como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (como HEPES), nucleotídeos (como adenosina e timidina), antibióticos (como droga GENTAMYCIN™), elementos traço (definidos como componentes inorgânicos usualmente presentes em concentração final na faixa micromolar) e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Qualquer outro suplemento necessário também pode ser incluído na concentração apropriada que seria conhecida pelos técnicos no assunto. As condições de cultura, como temperatura, pH e similares, são aquelas previamente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão evidentes para um técnico no assunto.

PURIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDEO

Um polipeptídeo ou proteína da invenção podem ser recuperados de um sujeito. Quando se utilizam técnicas recombinantes, um polipeptídeo da invenção pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplasmático ou secretado diretamente em um meio. Polipeptídeos da invenção podem ser

recuperadas do meio de cultura ou das células hospedeiras lisadas. Se ligado à membrana, pode ser liberado da membrana usando-se uma solução detergente adequada (por exemplo, Triton-X100) ou por clivagem enzimática. Células empregadas para expressão de um polipeptídeo da invenção podem
5 ser rompidas por vários meios físicos ou químicos, como ciclo de congelamento-descongelamento, sonicação, rompimento mecânico ou agentes de lise celular.

Os procedimentos a seguir são procedimentos de purificação de proteína adequados exemplares: fracionamento em uma coluna de troca iônica;
10 precipitação em etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia de heparina, cromatografia em SEPHAROSE™ ou em resina de troca aniônica ou catiônica, (como uma coluna de ácido poliaspártico, DEAE, etc.); *chromatofocusing*, SDS-PAGE, precipitação com sulfato de amônio, filtração em gel, por exemplo, Sephadex G-75, colunas de proteínas A
-15 Sefarose para remover contaminantes como IgG e colunas de metais quelados para ligar formas de polipeptídeos marcados da invenção aos epitopos. Vários métodos de purificação de proteína podem ser empregados e tais métodos são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*,
20 Springer-Verlag, Nova York (1982). As etapas de purificação selecionadas irão depender, por exemplo, da natureza do processo de produção usado e o polipeptídeo específico da invenção produzido.

Por exemplo, uma composição de anticorpo preparada a partir de células pode ser purificada usando-se, por exemplo, cromatografia em
25 hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise e cromatografia por afinidade, com cromatografia por afinidade sendo a técnica de purificação típica. A adequação da proteína A como um ligante de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer domínio Fc da imunoglobulina que está presente no anticorpo. A

proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados em cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isótopos de camundongo e para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). A

5 matriz para a qual o ligante de afinidade é ligado é frequentemente agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, como vidro poroso controlado ou poli(estireno-divinil)benzeno, permitem velocidades mais rápidas de fluxo e tempo de processamento mais curto do que aquele que pode ser atingido com agarose. Onde o anticorpo compreende

10 um domínio C_H3 , a resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para a purificação. Outras técnicas para purificação de proteína, por exemplo, aquelas indicadas acima, estão também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado. Ver também, Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) que descreve um procedimento para isolamento de anticorpos que são

15 secretados no espaço periplasmático de *E.coli*.

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Formulações terapêuticas de agentes da invenção (antagonistas do VEGF, agente de redução de célula mielóide, antagonista de URCGP, antagonista de URRTP, agonista de DRCGP, agonista de DRRTP ou um

20 agente anti-câncer) e combinações destes e descritos no presente pedido usados de acordo com a invenção são preparadas para armazenamento pela mistura de uma molécula, por exemplo, polipeptídeo(s) tendo o grau desejado de purificação com carreadores opcionais, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª

25 edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Carreadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para receptores nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes

incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como octadecildimetilbenzil cloreto de amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butil ou álcool benzil; alquil parabenos como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos que cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina de 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 EDTA; açúcares como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; formação de sais de contra íons como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexo Zn-proteína); e/ou surfactantes não-iônicos como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

Os ingredientes ativos também podem ser colocados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de acumulação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de distribuição coloidal de droga (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas estão divulgadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980).

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Preparações de liberação contínua podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação contínua incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo um polipeptídeo da invenção, cujas matrizes estão na forma de artigos modelados, por

exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação contínua incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) ou poli(vinilálcool)), polilactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinil
5 não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-
10 butírico. 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 encapsuladas, permanecem no corpo por um longo tempo, eles podem desnaturar ou se agregar como um resultado da exposição à umidade a 37°C, resultando em uma perda de atividade biológica e possíveis mudanças na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser desenvolvidas para a
15 estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se o mecanismo de agregação é descoberto como sendo de 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
20 desenvolvimento de composições de matriz de polímero específicas. Ver também, por exemplo, patente US 6.699.501, que descreve cápsulas com revestimento de polieletrólitos.

É ainda contemplado que um agente da invenção (por exemplo, antagonista do VEGF, agente de redução de célula mielóide, agente
25 quimioterápico ou agente anti-câncer) pode ser introduzido em um sujeito por terapia gênica. Terapia gênica refere-se à terapia realizada pela administração de um ácido nucléico a um sujeito. Nas aplicações de terapia gênica, os genes são introduzidos nas células com o objetivo de alcançar a síntese *in vivo* de um

produto genético terapeuticamente efetivo, por exemplo, para substituição de um gene defeituoso. "Terapia gênica" inclui tanto a terapia gênica convencional, onde um efeito durável é alcançado por um único tratamento, como administração dos agentes terapêuticos do gene, que envolve

5 administração única ou repetida de um DNA ou mRNA terapeuticamente efetivo. RNAs e DNAs *antisense* podem ser usados como agentes terapêuticos para bloqueio da expressão de certos genes *in vivo*. Já foi mostrado que oligonucleotídeos *antisense* podem ser importados para células onde eles agem como inibidores, apesar das baixas concentrações

10 intracelulares causadas pela absorção restrita da membrana celular. (Zamecnik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 (1986)). Os oligonucleotídeos podem ser modificados para aumentar sua absorção, por exemplo, pela substituição de seus grupos fosfodiésteres por grupos não carregados. Para revisões gerais dos métodos da terapia gênica, ver, por exemplo, Goldspiel *et*

15 *al. Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu e Wu *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan *Science* 260:926-932 (1993); Morgan e Anderson *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); e May *TIBTECH* 11:155-215 (1993). Métodos comumente conhecidos na técnica de tecnologia de DNA recombinante que podem ser usados estão

20 descritos em Ausubel *et al.* eds. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; e Kriegler (1990) *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY.

Existe uma variedade de técnicas disponíveis para introdução de ácidos nucléicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo se o

25 ácido nucléico é transferido para células cultivadas *in vitro*, ou *in vivo* para as células do hospedeiro pretendido. Técnicas adequadas para a transferência de ácido nucléico em células de mamíferos, *in vitro*, incluem o uso de lipossomos, eletroporação, microinjeção, fusão celular, DEAE-dextrano, método de

precipitação de fosfato de cálcio, etc. As técnicas atuais de transferência de gene *in vivo* preferidas incluem transfecção com vetores virais (tipicamente retroviral) e transfecção mediada por lipossomo revestido com proteína (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 (1993)). Por exemplo, técnicas de

5 transferência de ácido nucléico *in vivo* incluem transfecção com vetores virais (como adenovírus, vírus *Herpes simplex* I, lentivírus, retrovírus ou vírus adeno-associados) e sistemas baseados em lipídeos (lipídeos úteis para transferência de gene mediada por lipídeo são DOTMA, DOPE e DC-Chol, por exemplo). Exemplos de vetores virais úteis na terapia gênica podem ser encontrados em

10 Clowes *et al. J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem *et al. Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons e Gunzberg *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); Grossman e Wilson *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993); Bout *et al. Human Gene Therapy* 5:3 -10 (1994); Rosenfeld *et al. Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al. Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli *et al. J. Clin.*

15 *Invest.* 91:225-234 (1993); e Walsh *et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993).

Em algumas situações é desejável fornecer a fonte de ácido nucléico com um agente que atinge as células alvo, como um anticorpo específico para uma proteína de superfície de membrana celular ou da célula

20 alvo, um ligante para um receptor na célula alvo, etc. Onde lipossomos são empregados, proteínas que se ligam a uma proteína de superfície da membrana celular associada com endocitose, podem ser usadas para direcionar e/ou facilitar a absorção, por exemplo, proteínas capsídeo ou fragmentos destas que influenciam um tipo celular específico, anticorpos para

25 proteínas que sofrem internalização em ciclos, e proteínas que atingem locais intracelulares e aumentam a meia vida intracelular. A técnica de endocitose mediada por receptor é descrita, por exemplo, por Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987); e Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87:3410-

3414 (1990). Para revisão de marcação de gene e terapia gênica atualmente conhecida ver Anderson *et al.*, *Science* 256:808-813 (1992).

DOSAGEM E ADMINISTRAÇÃO

Os agentes da invenção (antagonistas do VEGF, agente de
5 redução de célula mielóide, agente quimioterápico ou agente anti-câncer) são administrados a um paciente humano, de acordo com métodos conhecidos, como administração intravenosa, como um bólus ou por infusão contínua por um período de tempo, por rotas intramuscular, intraperitoneal, intracérebro-
espinhal, subcutânea, intra-articulares, intrasinovial, intratecal, oral, tópica ou
10 por inalação e/ou administração subcutânea.

Em certas realizações, o tratamento da invenção envolve a administração combinada de um antagonista do VEGF e um ou mais agentes de redução de célula mielóide ou agente quimioterápico. Em uma realização, agentes anti-câncer adicionais estão presentes, por exemplo, um ou mais
15 agentes anti-angiogênese diferentes, um ou mais agentes quimioterápicos, etc. A invenção também contempla a administração de múltiplos inibidores, por exemplo, múltiplos anticorpos para o mesmo antígeno ou múltiplos anticorpos para proteínas diferentes da invenção. Em uma realização, um coquetel de diferentes agentes quimioterápicos é administrado com o antagonista do VEGF
20 e/ou com um ou mais agentes de redução de célula mielóide. A administração combinada inclui co-administração, usando-se formulações separadas ou uma formulação farmacêutica única e/ou administração consecutiva, em qualquer ordem. Por exemplo, o antagonista do VEGF pode anteceder, seguir ou alternar com a administração do agente de redução de célula mielóide ou
25 agente quimioterápico, ou pode ser dado simultaneamente com estes. Em uma realização, há um período de tempo enquanto ambos (ou todos) os agentes ativos exercem simultaneamente suas atividades biológicas.

Para a prevenção ou tratamento da doença, a dosagem

apropriada do agente da invenção dependerá o tipo de doença a ser tratada, como definido acima, a severidade e curso da doença, se o inibidor é administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapias prévias, o histórico clínico do paciente e resposta ao inibidor, e a discricção do médico. O inibidor é adequadamente administrado ao paciente uma vez ou no decorrer de uma série de tratamentos. Em um regime de combinação de terapia, as composições da invenção são administradas em uma quantidade terapeuticamente efetiva ou em uma quantidade terapeuticamente sinérgica. Como usado no presente pedido, uma quantidade terapeuticamente efetiva é tal que a administração de uma composição da invenção e/ou co-administração do antagonista do VEGF e um ou mais agentes terapêuticos, resulte na redução ou inibição da doença ou condição alvo. O efeito da administração de uma combinação de agentes pode ser aditivo. Em uma realização, o resultado da administração é um efeito sinérgico. Uma quantidade terapeuticamente sinérgica é aquela quantidade de antagonista do VEGF e um ou mais agentes terapêuticos, por exemplo, agente de redução de célula mielóide, um agente quimioterápico ou um agente anti-câncer, necessária para reduzir ou eliminar condições ou sintomas associados com uma doença específica, de forma sinérgica ou significativa.

Dependendo do tipo e severidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por exemplo, 0,1-20 mg/kg) de antagonista do VEGF ou agente de redução de célula mielóide é uma dosagem candidata inicial para administração ao paciente, por exemplo, para uma ou mais administrações separadas ou por infusão contínua. Uma dosagem diária típica pode variar de cerca de 1µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores acima mencionados. Para administrações repetidas no decorrer de vários dias ou mais tempo, dependendo da condição, o tratamento é prolongado até que ocorra uma supressão dos sintomas da doença. No entanto, outros regimes de

dosagem podem ser funcionais. Tipicamente, o médico irá administrar uma molécula da invenção até alcançar uma dosagem que forneça o efeito biológico necessário. O progresso desta terapia da invenção é facilmente monitorado por técnicas e testes convencionais.

5 Por exemplo, a preparação e programação de dosagens para inibidores da angiogênese, por exemplo, anticorpos anti-VEGF, como AVASTIN® (Genentech), pode ser usada de acordo com instruções do fabricante ou conforme determinado empiricamente pelo técnico no assunto. Em outro exemplo, a preparação e programação de dosagens para tais
10 agentes quimioterápicos podem ser usadas de acordo com instruções do fabricante ou conforme determinado empiricamente pelo técnico no assunto. A preparação e a programação de dosagens para quimioterapia também estão descritas em *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

EFICÁCIA DO TRATAMENTO

15 A eficácia do tratamento da invenção pode ser medida por vários pontos de medição comumente usados na valiação de disfunções neoplásicas ou não neoplásicas. Por exemplo, tratamentos contra o câncer podem ser avaliados, mas não limitados, por exemplo, pelo peso do tumor ou tamanho da
20 redução, tempo de progressão, duração da sobrevida, sobrevida livre de progressão, taxa geral de resposta, duração da resposta, qualidade de vida, expressão e/ou atividade da proteína. Devido aos agentes anti-angiogênicos descritos no presente pedido serem dirigidos à vasculatura e não necessariamente às próprias células neoplásicas, eles representam uma classe
25 exclusiva de drogas anti-câncer e, dessa forma, exigem medições e definições exclusivas de respostas clínicas às drogas. Por exemplo, a redução do tumor em mais de 50% em uma análise bidimensional é o padrão de corte para afirmar uma resposta. No entanto, os inibidores da invenção podem causar

inibição da dispersão metastática sem redução do tumor primário, ou podem simplesmente exercer um efeito de interrupção no crescimento do tumor. Consequentemente, abordagens para se determinar a eficácia da terapia podem ser empregadas, incluindo, por exemplo, medições de marcadores, no plasma ou urinários, de angiogênese e medições da resposta através de imagem radiológica.

ARTIGOS DE FABRICAÇÃO

Em outra realização da invenção, é fornecido um artigo de fabricação que contém materiais úteis para o tratamento das disfunções ou diagnósticos das disfunções descritas acima. O artigo de fabricação compreende um recipiente, um rótulo e uma bula. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os recipientes podem ser formados por uma variedade de materiais, como vidro ou plástico. Em uma realização, o recipiente contém uma composição que é eficaz para tratar a condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco que possui uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Ao menos um agente ativo na composição é um modulador do VEGF e pelo menos um segundo agente ativo é um agente de redução de célula mielóide e/ou um agente quimioterápico. O rótulo do recipiente, ou associado ao mesmo, indica que a composição é usada para tratar a condição de escolha. O artigo de fabricação pode, além disso, compreender um segundo recipiente que compreende um tampão farmacologicamente aceitável, como fosfato salino tamponado, solução de Ringer e solução de dextrose. Em outra realização, o recipiente possui um conjunto de marcadores diagnósticos para detectar tumores resistentes. Pelo menos um agente na composição é um marcador para detectar Gr1, uma elastase de neutrófilo, CD19, CD90, CD11c, URCGP, URRTP, DRCGP e/ou DRRTTP. O rótulo do recipiente, ou associado ao mesmo, indica que a

composição é usada para diagnosticar um tumor resistente ao tratamento com VEGF. O artigo de fabricação da invenção pode, ainda, incluir outros materiais desejáveis, de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros agentes ativos adicionais, outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

5

EXEMPLOS

Deve-se entender que os exemplos e realizações descritas no presente pedido são somente para propósitos ilustrativos e que várias modificações ou mudanças em consideração a estas serão sugeridas para os técnicos no assunto e devem ser incluídas dentro do espírito e limite deste

10 pedido e escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLO 1

TUMOR RESISTENTE AO TRATAMENTO COM ANTI-VEGF CONFERIDO POR CÉLULAS

MIELOIDES CD11b+Gr1+

Foram investigados eventos celulares e moleculares que levaram

15 à resistência de tumores experimentais ao tratamento com anticorpos contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Foi observada uma correlação entre o recrutamento de células derivadas da medula óssea e o desenvolvimento de resistência tumoral ao tratamento com anti-VEGF. Experimentos com mistura de células demonstraram que células CD11b+Gr1+

20 isoladas tanto a partir da medula óssea como de camundongos portadores de tumores resistentes ao tratamento com anti-VEGF (mas não sensíveis ao anti-VEGF), são suficientes para conferir resistência ao tratamento com anti-VEGF. Meios *in vitro*, condicionados, de tumores resistentes ao anti-VEGF (mas não tumores sensíveis ao anti-VEGF) estimularam a migração de células

25 CD11b+Gr1+. O recrutamento de células CD11b+Gr1+ para os tumores primários representa um mecanismo celular mediador de resistência ao tratamento com anti-VEGF. A análise da expressão gênica de tumores preparados com células CD11b+Gr1+ indicou um grupo distinto de genes

regulados por tumores resistentes. A mobilização e a ativação de células mielóides CD11b+Gr1+ podem representar duas etapas do desenvolvimento de resistência ao tratamento com anti-VEGF. A combinação de tratamento com compostos dirigidos às células mielóides com anti-VEGF suprimiu, ainda, a angiogênese e o crescimento tumoral, retardando a instalação de resistência ao anti-VEGF e demonstrando o benefício terapêutico da combinação de compostos dirigida às células mielóides e VEGF.

MÉTODOS

LINHAGENS CELULARES.

As linhagens EL4, LLC, B16F1 e TIB6 (J558) de células tumorais foram obtidas da Coleção Americana de Tipo de Cultura (ATCC) e mantidas em cultura de tecido em meio Dulbecco Modificado (DMEM) com alta concentração de glicose e suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% e 2 mM de glutamina. Os termos "B16F1" e "B16" são usados no presente pedido de modo intercambiável para a mesma linhagem celular de melanoma.

ANTICORPOS

Os anticorpos anti-VEGF, como o G6-23, se ligam e neutralizam as formas de VEGF murino e humano. Derivada da tecnologia de exibição por fago, a porção IgG compreende o isotipo murino de IgG2a (ver, por exemplo, Malik, A.K. *et al.* Redundant roles of VEGF-B and PlGF during selective VEGF-A blockade in mice. *Blood* 107:550-7 (2006)) e foi dosada a 10 mg/kg, IP, duas vezes por semana, a menos que indicado de outra forma. O anticorpo controle equiparado para isotipo foi o anti-erva-de-santiago-IgG2a humano (Genentech, Inc.). Anticorpos anti-CD11b+ (eBioSciences), anti-L-selectina (BD BioSciences) e anti-CXCR4 (Torrey Pines Lab) foram usados em experimentos FACS. O anticorpo anti-Gr1 MAb (eBioSciences, CA ou BD BioSciences, Califórnia) foi administrado a 10 mg/kg, IP, duas vezes por semana. Também foi administrado por via IP a camundongos C57Bl/6 (n=5) um inibidor da

elastase (1 mg/camundongo; eBiosciences, San Diego, Califórnia), diariamente, a partir do dia 01 após o implante de 5×10^6 células EL4 ou LLC. Os tumores foram medidos duas vezes por semana e sua pesagem final foi determinada como descrito acima.

5 MODELO DE CAMUNDONGO QUIMÉRICO C57BL/6 GFP

Camundongos transgênicos C57BL/6 com aumento de proteína fluorescente verde (EGFP) (C57BL/6-TgN; ACTbEGFP;10sb; JAX stock# 003291) e idade entre 6–8 semanas foram obtidos dos Laboratórios Charles River e Jackson, respectivamente. A EGFP é controlada pelo promotor de β -actina, abundante em todas as células de camundongos transgênicos EGFP (ver, por exemplo, Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. & Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-9 (1997)). Camundongos quiméricos C57BL/6 GFP foram gerados através da irradiação letal (11 Gy, irradiado por Cs) de camundongos C57BL/6 para ablação da medula óssea endógena, seguido por resgate com 5×10^6 células BMMNC isoladas de camundongos transgênicos EGFP. As BMMNCs foram preparadas como descrito acima (veja Gerber, H.P. *et al.* VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417:954-8. (2002)). Todos os experimentos com xenoenxertos tumorais em camundongos quiméricos foram realizados pelo menos 4 semanas após reconstituição hematopoiética. Para experimentos de crescimento tumoral, 5×10^6 células tumorais de murino EL4 ou LLC foram injetadas por via subcutânea na região dorsal. Para experimentos em camundongos XID, 1×10^7 células tumorais LLC ou EL4 foram implantadas.

25 EXPERIMENTOS COM MISTURA DE B16F1

Foram realizados estudos de crescimento tumoral tanto em camundongos nus beges XID (Harlan Sprague Dawley) como camundongos C57BL/6 (Jackson Lab, Bar harbor), ou com a medula óssea GFP de

camundongos quiméricos. 5×10^6 ou 10^7 células tumorais (como indicado) foram resuspensas em 200 μ l de MatriGel (Fator de Crescimento reduzido; BD BioSciences, CA) e injetadas por via subcutânea no flanco dorsal dos camundongos. Para experimentos de medula óssea, misturados, 10^6 células BMMNC ou CD11b+Gr1+ isoladas da medula óssea foram misturadas a $2,5 \times 10^6$ células B16F1 em 200 μ l de matrigel (BD BioSciences) e imediatamente implantadas no flanco de camundongos C57BL/6. Para experimentos de mistura de tumores GFP+/CD11b+Gr1+, 2×10^6 células B16F1 foram colocadas juntamente com 3×10^5 células GFP+ e implantadas como descrito acima. O tratamento com anticorpos anti-VEGF (G6-23) ou controle (anti-erva-de-santiago) foi iniciado 4 dias após a inoculação das células tumorais. O tamanho dos tumores foi medido com paquímetros Vernier 2–3 vezes por semana assim que os tumores alcançaram um tamanho palpável. O volume tumoral foi determinado através da fórmula $\frac{\pi}{6} \times L \times W \times W$ sendo L o diâmetro mais longo e W o diâmetro em posição perpendicular a L.

QUIMIOTERAPIA

Camundongos C57BL/6 receberam implantes de linhagens celulares TIB6, B16F1, EL4 e LLC. Os camundongos não receberam nenhum tratamento nos primeiros 4 dias após o implante para que se permitisse o estabelecimento das células tumorais. Agentes quimioterápicos incluindo 5-Fluor uracil (5FU, American Pharmaceutical Partner, IL; 50 mg/kg, uma vez por semana) e Gencitabina (Eli Lilly Co, IN, 120 mg/kg, duas vezes por semana) foram administrados por via IP. O volume tumoral foi medido duas vezes por semana e calculado como descrito acima.

IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Para análise de imunofluorescência, os tumores foram coletados e congelados em temperatura ideal de corte (OCT) para criocorte. Todos os criocortes de tumores medindo 6 μ m foram desidratados em temperatura

ambiente por 1 hora e fixados com acetona por 10 minutos a -20°C. Após a secagem por exposição ao ar por 4 minutos em temperatura ambiente, os sítios de ligação não-específica foram bloqueados por incubação durante 1 hora sob temperatura ambiente em soro normal de cabra a 20% (NGS, GIBCO #16210-064; constituído em fosfato salino tamponado ("PBS")). Os cortes foram corados sequencialmente com os seguintes anticorpos diluídos em solução DAKO Block (DakoCytomation, CA), AlexaFluor 488 anti-GFP de coelho conjugado (Molecular Probes) mantido em diluição a 20 µg/mL por 1 hora sob temperatura ambiente, AlexaFluor 488 caprino anti-coelho conjugado (Molecular Probes) mantido em diluição de 1:500 por 1 hora sob temperatura ambiente, PECAM-1 de rato anti-camundongo (Clone MEC13.3; BD Pharmingen) mantido em diluição de 1:100 durante toda a noite a 4°C, e AlexaFluor 594 caprino anti-rato conjugado (Molecular Probes) mantido em diluição de 1:500 por 1 hora sob temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e montadas em meio fluorescente DAKO, e as imagens de imunofluorescência foram obtidas com um microscópio Nikon equipado com lente objetiva Plan-Neofluar de 20x reunidas digitalmente.

MEDIDA DA ÁREA DE SUPERFÍCIE VASCULAR (VSA)

A área de superfície vascular tumoral foi quantificada a partir das imagens digitais de cortes corados com CD31 usando-se lente objetiva de 20x. Tipicamente, os pixels correspondentes aos vasos corados foram selecionados usando-se o programa ImageJ, baseado no limiar pré-estabelecido de 50–70 para corte. Desvios de pixels contaminados (não-vaso) foram descartados. A menos que indicado de outra forma, foram analisados 3–5 tumores por grupo. Foram gravadas 15 imagens de cada corte dos tumores, cada uma delas cobrindo uma área de 1502 µm². A menos que indicado de outra forma, a coloração de fundo de cada grupo foi determinada usando-se um anticorpo controle marcado e subtraído na contagem total de vasos. A área de pixel dos

agregados de vasos relativa à área total da figura e área total analisada é apresentada como % de vasos/área superficial. Em uma realização, a área de superfície vascular pode ser quantificada usando-se um método quantitativo não-invasivo, incluindo, mas não se limitando, ao exame de imagem por ressonância magnética, à ressonância magnética com aumento de contraste dinâmico, à tomografia computadorizada (TC) e à tomografia por emissão de pósitrons (PET). Ver, por exemplo, O'Connor *et al.*, *British Journal of Cancer* 96:189-195 (2007). Em certas realizações, o agente de contraste gadolínio e seus complexos e derivados podem ser usados no exame de imagem por ressonância magnética.

CITOMETRIA DE FLUXO

Tumores de animais controle e tumores tratados com anti-VEGF foram isolados e uma única suspensão de células foi gerada a partir do corte de pedaços de tecido tumoral processados por um homogeneizador celular (VWR). Células BMMNC foram obtidas do fêmur e tíbia de animais implantados e submetidas a lise de RBC usando-se tampão ACK (Cambrex, MA). Sangue periférico foi coletado por sangramento retro-orbital, sendo que 40 µl do mesmo foram pré-tratadas com tampão ACK para lise de glóbulos vermelhos.

Células da medula óssea, tumor ou sangue periférico foram coradas com uma série de anticorpos monoclonais incluindo CD11b, Gr1, CD19, CD90, VEGFR2, CXCR4, L-Selectina2 (todos produzidos pela BD BioSciences, CA), VEGFR1 (R&D, CA), Tie2 (eBioSciences, CA) juntamente com isotipos de controle adequado para investigar as frações mieloide e linfoide em cada compartimento. Os dados de FACS foram obtidos com aparelhos FACS e analisados com base no software Cell Quest Pro (BD Biosciences).

Para isolar células GFP⁺ e/ou CD11b⁺Gr1⁺, uma suspensão

única de células foi produzida a partir da medula óssea ou tumores de camundongos implantados. As células foram coradas com anti-CD11b conjugado a APC e anti-Gr1 conjugado a PE. Populações de células GFP, GFP-, CD11b+Gr1+ e CD11b-Gr1- foram isoladas com um dispositivo FACS Vantage e a análise pós-seleção assegurou a pureza da população de interesse em cada compartimento.

MICROARRANJOS

O RNA de células CD11b+Gr1+ derivadas da medula óssea foi isolado com o uso do kit Qiagen Rneasy (Qiagen). Os métodos para o preparo de RNA complementar (cRNA) e hibridização/varredura dos arranjos foram fornecidos pela Affymetrix (Affymetrix, Inc.). Cinco µg de RNA total foram convertidos em cDNA dupla fita usando-se um kit de síntese de cDNA (SuperScript Choice, GIBCO/BRL) e um *primer* oligomérico T7-(dT)₂₄ (Biosearch Technologies, Inc., Custom Synthesis). O cDNA dupla fita foi purificado em uma resina de afinidade (Sample Cleanup Module Kit, Affymetrix, Inc.) e por precipitação em etanol. Depois da síntese de segunda fita, cRNA marcado foi gerado a partir da amostra de cDNA usando-se uma polimerase de T7 RNA e nucleotídeo marcado com biotina através de uma reação de transcrição *in vitro* (Enzo Biochem, Inc.). O cRNA marcado foi purificado em uma resina de afinidade (sample cleanup module kit, Affymetrix). A quantidade de cRNA marcado foi determinada pela medida de absorbância a 260 nm e com base na convenção de que 1 OD a 260 nm corresponde a 40 µg/mL de RNA. Vinte µg de cRNA foram fragmentados por incubação a 94°C por 30 minutos em 40 mM de triacetato (pH 8,1), 100 mM de acetato de potássio e 30 mM de acetato de magnésio. As amostras foram então hibridizadas para arranjos 430 2.0 do Genoma de Camundongo a 45 °C por 19 horas em um forno giratório ajustado em 60 rpm. As bandejas de arranjo foram lavadas e coradas na estação Affymetrix Fluidics e submetidas à varredura por um

scanner. A análise dos dados foi realizada pelos softwares Affymetrix GeneChip Analysis ou Spotfire (Spotfire, MA). Os genes com intensidade de sinal de pelo menos 1,5 vez acima do RNA de referência foram selecionados para análises adicionais. Em seguida, os genes com expressão
 5 significativamente ($p \leq 0,05$) diferente (acima de 1,5 vez na análise de CD11b e acima de 2 vezes na análise tumoral) nas amostras EL4 e LLC em comparação ao grupo B16F1 correspondente foram selecionados para a análise final. A análise genética de agrupamento hierárquico foi realizada em todos os tumores e dados de CD11b com base no algoritmo do software Spotfire (Spotfire).

10 TESTE DE MIGRAÇÃO CELULAR

As células tumorais foram isoladas como descrito para a análise de FACS e plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/mL em DMEM, 10% FCS e 4mM de meio com glutamina por 4 dias em uma incubadora de CO₂ para cultura de tecido. A concentração do meio foi proporcional ao volume original usando-se
 15 colunas Amicon spin (Millipore). 600 µl de amostras triplas foram utilizadas em placas *transwell* de migração celular (Corning). $2,5 \times 10^4$ células BMMNC recém-isoladas de camundongos C57BL/6 foram mantidas novamente em suspensão em DMEM e colocadas no compartimento superior das placas *transwell*, seguido pela incubação a 37 °C durante 9 horas, e a capacidade de migração dos BMMNCs foi
 20 medida pela contagem celular nos compartimentos inferiores.

ESTATÍSTICA

Utilizou-se o método ANOVA para determinar as diferenças significativas. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

25 A RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM ANTI-VEGF NÃO É CAUSADA POR DOSAGENS

ABAIXO DO IDEAL E É INDEPENDENTE DE LINFÓCITO

Para estabelecer um modelo experimental que permita avaliar a identidade e abundância relativa de células derivadas da medula óssea

(BMCs) em tumores tratados com anti-VEGF, células mononucleadas da medula óssea (BMMNC) marcadas com proteína fluorescente verde (GFP+) foram transferidas adotivamente para camundongos C57BL/6 submetidos a irradiações letais (ver, por exemplo, Okabe, M. *et al.*, 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-9 (1997)).

Linhagens de células tumorais singênicas de C57BL/6 foram implantadas em camundongos com medula óssea quimérica GFP+ e os efeitos de um anticorpo neutralizador de VEGF (G6-23 (ver, por exemplo, Malik, A.K. *et al.* Redundant roles of VEGF-B and PlGF during selective VEGF-A blockade in mice. *Blood* (2005)) sobre o crescimento tumoral e a angiogênese foram avaliados. Estas linhagens celulares incluíram uma linhagem de melanoma (B16F1), duas linhagens de linfoma de células T (EL4 e TIB6) e uma linhagem celular de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). Os termos "B16F1" e "B16" são usados no presente pedido de modo intercambiável para a mesma linhagem celular de melanoma. O crescimento de tumores B16F1 foi bloqueado por anti-VEGF (G6-23) (**Fig. 1a**). Em um experimento separado, o crescimento de tumores TIB6 também foi significativamente bloqueado por anti-VEGF. Contudo, os tumores EL4 e LLC somente foram suprimidos de modo transitório e, após um atraso inicial no crescimento, os tumores passaram para a rápida expansão (**Fig. 1a**). De forma similar, o tratamento com G6-23 dos tumores EL4 (**Fig. 1b**) e LLC (**Fig. 1c**) implantados em camundongos nus beges com imunodeficiência ligada a X (XID), levou somente ao atraso transitório do crescimento tumoral em todas as doses testadas. Estas descobertas indicam que a resistência ao tratamento com anti-VEGF ocorre de um modo independente de linfócito B e T. A resistência dos tumores EL4 e LLC não foi causada pelas doses abaixo do ideal do anticorpo anti-VEGF neste modelo (**Fig. 1b e 1c**).

AUSÊNCIA DE PROGENITORES DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DERIVADAS DA MEDULA
ÓSSEA (BM-EPCs) NA VASCULATURA DE TUMORES SENSÍVEIS E RESISTENTES AO
ANTI-VEGF

A análise de seleção celular ativada por fluorescência (FACS) dos isolados tumorais EL4 e LLC revelou um aumento na frequência ($p \leq 0,05$) de células da medula óssea GFP+ em tumores resistentes, tanto em camundongos controle como nos que receberam anti-VEGF, comparado aos tumores sensíveis ao anti-VEGF, sugerindo que a resistência ao tratamento com anti-VEGF está ligada ao recrutamento de BMMNCs (**Fig. 1d**). Para elucidar se as BMMNCs infiltrativas contribuem diretamente para a vasculatura tumoral, foi utilizada uma coloração dupla da molécula de adesão endotelial plaquetária (CD31, PECAM)/GFP para quantificar a área de superfície microvascular e o número de EPCs (PECAM) GFP+/CD31+ nos cortes tumorais. No 14º dia de tratamento, e independentemente do tipo de tumor, a grande maioria das estruturas vasculares CD31+ em tumores tratados com anti-VEGF ou controle não demonstrou expressão de GFP+ (**Fig. 1e**). Tais resultados sugerem que o recrutamento de BM-EPC para a vasculatura tumoral não contribui diretamente para a formação da mesma em tumores resistentes ou sensíveis ao anti-VEGF. Os tumores EL4 e LLC tratados com anti-VEGF exibiram redução de 2 a 3 vezes na área da superfície vascular em comparação com os tumores controle (**Fig. 1f**), correlacionada a uma redução semelhante no peso dos tumores. A redução nos vasos CD31+ após tratamento com anti-VEGF foi mais intensa nos tumores B16F1 sensíveis ao anti-VEGF em comparação aos tumores EL4 e LLC resistentes ao anti-VEGF. Além disso, a análise da área de superfície vascular (VSA) exibiu uma redução significativa ($p \leq 0,05$) de vasos CD31+ após tratamento com anti-VEGF em tumores sensíveis comparado aos resistentes (**Fig. 1f**).

**RECRUTAMENTO E PREPARAÇÃO DE BMMNCs SÃO IMPORTANTES PARA A
RESISTÊNCIA AO ANTI-VEGF**

Os experimentos com mistura de tumores foram conduzidos com amostras de B16F1 sensíveis ao anti-VEGF para avaliar a relevância funcional de BMMNCs GFP+ no desenvolvimento de resistência ao tratamento com anti-VEGF. Ver **Figs. 6a e b**, e a **Fig. 7** para o projeto experimental e pureza celular. Para realizar experimentos quiméricos com medula óssea e tumores, células GFP+ foram isoladas dos tumores ou da medula óssea de camundongos implantados com tumores resistentes e sensíveis. A análise pós-seleção assegura a pureza das células GFP+ em cada compartimento. A mistura de células B16F1 e BMMNCs preparadas por tumores resistentes revelou um efeito estimulatório de crescimento significativo ($p \leq 0,05$) (**Figs. 2a, b**). Ao contrário, as taxas de crescimento de tumores B16F1, quando misturados a células BMMNC preparadas por tumores B16F1 ou implantes controle de matrigel, não foram significativamente alterados (**Figs. 2a, b**). As células BMMNC isoladas da tibia de camundongos portadores de tumores EL4 e LLC, misturados com tumores B16F1, apresentaram aumento significativo das taxas de crescimento tumoral em comparação aos BMMNCs de camundongos com implante matrigel ou controle (**Fig. 2a**). As diferenças nas taxas de crescimento tumoral foram mais pronunciadas nos grupos tratados com anticorpos anti-VEGF (**Fig. 2b**) em comparação aos grupos tratados com anticorpos controle (**Fig. 2a**). Ao contrário, as taxas de crescimento em tumores B16F1 não aumentaram significativamente quando misturados com células BMMNCs preparadas de tumores B16F1 ou matrigel controle, independentemente do tratamento (**Figs. 2a, b**). Da mesma forma, células GFP+ isoladas de tumores EL4 e LLC após 14 dias de crescimento foram suficientes para mediar resistência ao tratamento com anti-VEGF quando misturadas com células tumorais B16F1 sensíveis ao anti-VEGF (**Figs. 2c, d**).

As células BMMNC GFP+ ou CD11b+Gr1+ não deram origem a tumores quando implantadas isoladamente, demonstrando a ausência de células tumorais contaminantes. A proximidade física entre BMMNCs e células tumorais sensíveis a anti-VEGF não é, por si só, suficiente para induzir resistência, e o mecanismo de preparação das células da medula óssea por tumores resistentes a anticorpos anti-VEGF é necessário para a mediação da resistência tumoral. Combinados, estes dados indicam que tanto o recrutamento de células BMMNC para os tumores como o mecanismo de preparação de tumores resistentes constituem dois passos em uma cascata de eventos que leva ao desenvolvimento de resistência ao tratamento com anti-VEGF.

CÉLULAS CD11B+GR1+ PREPARADAS POR TUMORES RESISTENTES CONSTITUEM A POPULAÇÃO PRINCIPAL DA MEDULA ÓSSEA NA MEDIAÇÃO DE RESISTÊNCIA AO ANTI-VEGF

As BMMNCs compreendem uma população heterogênea que inclui células de linhagens primitivas, mielóides e linfóides. Morrison, S.J. *et al.*, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:35-71 (1995).

Os dados mostrados nas Figuras 3a-d sugerem que as células CD11b+Gr1+, que representam a população mielóide, formam o subgrupo principal de BMMNCs no desenvolvimento de resistência anti-VEGF. Veja, por exemplo, Onai, N. *et al.*, *Blood*, 96:2074-2080 (2000). Um ensaio *in vitro* de migração celular foi desenvolvido para testar BMMNCs expostas a um extrato solúvel coletado de tumores sensíveis e resistentes. Os tumores cresceram durante 14 dias em camundongos tratados tanto com anticorpos anti-VEGF como controle. O teste de migração *in vitro* indicou uma capacidade de migração maior ($p \leq 0,05$) das células BM CD11b+Gr1+ em direção aos extratos solúveis de tumores resistentes, mas não de tumores sensíveis (Fig. 3a). Portanto, fatores de quimio-atração mielóide estão presentes nos extratos

solúveis tanto de tumores tratados com anti-VEGF como anticorpos controle, e que permaneceram não afetados após a adição do anti-VEGF (10 µg/mL) ao meio. Tais descobertas sugerem que o recrutamento de células mielóides é intrínseco ao tumor, independente do VEGF-e não é induzido pelo tratamento.

5 Estas descobertas condizem com dados obtidos em experimentos de crescimento tumoral (**Fig. 1d**), nos quais o tratamento com anti-VEGF não bloqueou efetivamente o deslocamento de BMMNCs em direção a tumores resistentes, e apóia ainda a noção de que o recrutamento de células mielóides é intrínseco aos tumores e não induzido pelo tratamento.

10 Dada a intensificação da migração de células CD11b+Gr1+ em resposta ao meio condicionado originado de tumores resistentes ao anti-VEGF (**Fig. 3a**), foi realizada a análise FACS para avaliar as linhagens hematopoiética, linfoide e mieloide recrutadas por tumores EL4 e LLC desenvolvidos em camundongos. Quando mantidos juntamente com o
15 subgrupo CD11b+, os tumores EL4 e LLC exibiram aumento de células CD11b+Gr1+ em comparação aos tumores B16F1 (**Fig. 3b**). As diferenças foram mais pronunciadas em tumores tratados com anti-VEGF. Nos tumores B16F1, a população de células CD11b+Gr1+ foi marcadamente reduzida após tratamento com anti-VEGF, permanecendo inalteradas em tumores EL4 ou LLC
20 (**Fig. 3b**). Em outro experimento, o compartimento mielóide em camundongos portadores de tumores TIB6, B16F1, EL4 e LLC foi analisado com um dispositivo de FACS e anticorpos monoclonais contra CD11b e Gr1. A análise de citometria de fluxo de BMMNCs infiltrativos em isolados de tumores EL4 e LLC demonstrou o aumento significativo de ($p \leq 0,05$) células CD11b⁺Gr1⁺ em
25 comparação aos tumores TIB6 e B16F1. Estes resultados estão de acordo com os níveis reduzidos de BMMNCs em tumores sensíveis ao anti-VEGF (**Fig. 1d**), e fornecem novas evidências de apoio à correlação entre o recrutamento de células CD11b+Gr1+ por tumores e o desenvolvimento de resistência ao

medicamento. Ao contrário dos dados obtidos de isolados de CD11b+Gr1+ em tumores, foram observadas mudanças menos pronunciadas em subgrupos da medula óssea CD11b+ em camundongos portadores de tumor (**Fig. 3c**). Estes dados sugerem uma troca de informações paralela distinta entre medula óssea e tumores em camundongos portadores de tumores resistentes, pois recrutam mais células CD11b+Gr1+ e instruem a medula óssea a gerar mais células mielóides.

A análise mais aprofundada das células CD11b+Gr1+ em tumores resistentes e sensíveis revelou uma expressão mais intensa de moléculas sabidamente envolvidas no deslocamento e migração transendotelial de células mielóides como CXCR4 e L-Selectina, respectivamente. O número relativo de células CD11b+CD31+ (EPCs) e CD11b+CXCR4+ (neutrófilos), CD19 (células B), CD90 (células T), CD11c (células dendríticas) e VEGFR-2 em BMMNCs de camundongos portadores de tumor foram semelhantes entre os grupos de tratamento e tipos de tumor, exceto por CD19 em alguns tumores (**Fig. 14**).

Além de CD11b e Gr1, a expressão de outras linhagens hematopoiéticas como os linfócitos T e B, CD11c e também VEGFR1 e VEGFR2 foi investigada em camundongos portadores de tumor (**Fig. 15**). A redução significativa ($p \leq 0,05$) da frequência de linfócitos B e células dendríticas foi notável nos tumores resistentes (**Fig. 15a**). Além disso, os dados indicam uma diferença significativa em termos de frequência de linfócitos B e T, bem como células dendríticas, na medula óssea de camundongos portadores de tumores resistentes em comparação aos sensíveis correspondentes (**Fig. 15b**). Tais observações sugerem que o aumento da frequência de células mielóides em tumores resistentes está associado a uma redução em outras linhagens hematopoiéticas. Além da medula óssea e dos tumores, o baço dos camundongos portadores de tumores foi investigado, uma vez que estudos anteriores sugerem que os esplenócitos CD11b+Gr1+ contribuem para a

expansão tumoral. Ver, por exemplo, Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I., *Cancer Immunol Immunother*, 51:293-298 (2002); Bronte, V. *et al.*, *Blood*, 96:3838-3846 (2000). Em apoio aos dados obtidos com a análise da medula e dos tumores, foi observado um aumento ($p \leq 0,05$) na frequência de

5 esplenócitos CD11b+Gr1+ e aumento de tamanho dos baços ($p \leq 0,05$) nos camundongos implantados com tumores resistentes, comparado a tumores sensíveis (**Figs. 16a e b**). Juntas, estas observações sugerem um papel funcional para as células CD11b+Gr1+ como uma das populações mais importantes na mediação de resistência ao tratamento com anti-VEGF.

10 Para investigar a relevância funcional das células mielóides na resistência ao anti-VEGF, foram isoladas sub-populações de células CD11b+Gr1+ e CD11b⁻Gr1⁻ da medula óssea de camundongos preparados com tumores EL4 e LLC (**Fig. 17**), posteriormente misturadas com células tumorais B16F1.

15 Como mostrado na **Fig. 3d**, as células CD11b+Gr1+ foram suficientes para demonstrar resistência ao tratamento com anti-VEGF. No entanto, BMMNCs e células GFP+ derivadas de tumores depletadas de células CD11b+Gr1+ fracassaram em mediar resistência. As células CD11b+Gr1+ da medula de camundongos preparados com tumores resistentes ao anti-VEGF

20 podem mediar a resistência ao tratamento com anti-VEGF. Assim, a Figura 3d indica que as células CD11b+Gr1+ preparadas por tumores resistentes, mas não pelos sensíveis, mediam a resistência ao tratamento com anti-VEGF. No entanto, a mistura de B16F1 com células CD11b+Gr1+ isoladas a partir de B16F1 ou camundongos preparados com matrigel não promoveu resistência ao

25 tratamento com anti-VEGF quando comparado à população CD11b-Gr1- (**Fig. 17a**). Isto comprova, ainda, a hipótese de que tumores resistentes apresentam uma troca de informações paralela distinta com o compartimento mielóide em comparação aos tumores sensíveis. Para investigar o impacto das células

CD11b+Gr1+ sobre a vasculatura tumoral, a área de superfície vascular (VSA) em B16F1 misturado com células CD11b+Gr1+ e CD11b-Gr1- foi analisada (**Fig. 17b**). Estas descobertas indicam que a VSA na mistura de CD11b+Gr1+ é significativamente ($p \leq 0,05$) maior do que em B16F1 isoladamente ou na
 5 mistura com células CD11b-Gr1-, sugerindo que o desenvolvimento da vasculatura constitui uma das principais causas de resistência ao anti-VEGF, ao se misturar linhagens celulares sensíveis e células CD11b+Gr1+. Resultados semelhantes foram obtidos ao se avaliar tumores associados a células CD11b+Gr1+ isoladas de tumores resistentes por sua capacidade de
 10 conferir resistência a tumores sensíveis (**Figs. 3e, f**). Da mesma forma, tanto as células da medula óssea como aquelas associadas a tumores CD11b+Gr1+ são suficientes para conferir resistência ao tratamento com anti-VEGF quando testadas em uma abordagem de ganho de função celular.

TUMORES RESISTENTES AO ANTI-VEGF INDUZEM UM CONJUNTO ESPECÍFICO DE GENES NAS CÉLULAS CD11B+GR1+ DA MEDULA ÓSSEA

Para detectar diferenças potenciais no estado de ativação das células CD11b+Gr1+ na medula óssea de camundongos portadores de tumor, foi conduzida uma análise de expressão genética utilizando arranjos de DNA. A análise não-supervisionada de agrupamentos de células CD11b+Gr1+
 20 estimuladas por tumores EL4 ou LLC resistentes ao anti-VEGF identificou uma série de características de genes regulados de modo distinto das células estimuladas por tumores B16F1 sensíveis ao anti-VEGF (**Fig. 4a**). A análise ontogenética revelou o aumento de citocinas inflamatórias e marcadores de diferenciação de células macrófago/mielóide, além de alterações nos níveis de
 25 fatores pró e anti-angiogênicos por tumores resistentes ao tratamento com anti-VEGF (**Fig. 4b**). Foi identificado um conjunto de genes comumente supra-regulados pelos dois tumores resistentes ao anti-VEGF, dos quais muitos estão conhecidamente envolvidos na regulação da angiogênese, fator similar à

relaxina (RLF) (ver, por exemplo, Silvertown, J.D., Summerlee, A.J. & Klonisch, T. Relaxin-like peptides in cancer. *Int J Cancer* 107:513-9 (2003)), e escramblase fosfolipídica (Endo-Lip) (ver, por exemplo, Favre, C.J. *et al.* Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1917-38 (2003)).

Outra categoria de genes associados à diferenciação e/ou ativação de células mielóides foi supra-regulado principalmente nas células CD11b+Gr1+ por tumores resistentes ao anti-VEGF, incluindo receptores de IL-4 (ver, por exemplo, Palmer-Crocker, R.L., Hughes, C.C. & Pober, J.S. IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma c chain. *J Clin Invest* 98:604-9 (1996)) e IL-13 (ver, por exemplo, Roy, B. *et al.* IL-13 signal transduction in human monocytes: phosphorylation of receptor components, association with Jaks, and phosphorylation/activation of Stats. *J Leukoc Biol* 72:580-9 (2002)), CD14 (ver, por exemplo, Scott, C.S. *et al.* Flow cytometric analysis of membrane CD11b, CD11c and CD14 expression in acute myeloid leukaemia: relationships with monocytic subtypes and the concept of relative antigen expression. *Eur J Haematol* 44:24-9 (1990)), TLR-1 (ver, por exemplo, Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K. & Yan, Z.Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105:1158-61 (2002)) (Fig. 4). Da mesma forma, a trombospodina-1, um inibidor potente da angiogênese (ver, por exemplo, Good, D. *et al.* A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87:6624-6628 (1990); e, Iruela-Arispe, M.L., Bornstein, P. & Sage, H. Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 88:5026-30 (1991)), está entre os genes significativamente infra-regulados pelos dois tumores resistentes ao anti-VEGF.

Outro experimento de microarranjo mostrou que tumores resistentes apresentam um perfil distinto de expressão gênica. Foram realizadas análises da árvore genética de células CD11b+Gr1+ obtidas da medula óssea de camundongos implantados com tumores EL4 (E1-3), LLC (L1-3), B16F1 (B1-3) e TIB6 (T1-3) e tratados com anti-VEGF. Foram identificados genes infra-regulados, sem alterações e supra-regulados. Um conjunto característico de alterações induzidas por tumores resistentes ao anti-VEGF, distinto daquele induzido por tumores sensíveis ao anti-VEGF, foi identificado. Foi realizada a análise de arranjo de genes expressos diferencialmente em células CD11b+Gr1+ de medula óssea isoladas de camundongos portadores de tumores TIB6, B16F1, EL4 ou LLC e tratados com anti-VEGF por 17 dias. Foram identificados os genes potencialmente envolvidos na regulação da angiogênese ou na diferenciação e migração de células mielóides, com alterações significativas ($p \leq 0,05$, $> 1,5$ vez) nos níveis de expressão em tumores resistentes *versus* tumores sensíveis. Genes supra-regulados sabidamente envolvidos na regulação da angiogênese incluíram receptores de interleucina-11 (IL-11R), receptor II de interleucina-1 (IL-1RII), interferon transmembrana 1 (IFN TM1), membro 18 da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNFRSF18), integração Wingless 5A (WNT5A), carregador secretório de membrana 1, proteína de choque térmico (HSP86), receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor Eph B2 (EphRB2), proteína G acoplada ao receptor 25 (GPCR25), fator de crescimento derivado de hepatoma (HGF), angiopoietina similar-6, receptor efrina RA7 (Eph-RA7), semaforina Vlb, neurotrofina 5, claudina-18, metaloprotease-disintegrina MDC15 (MDC15), matriz extracelular (ECM) e uma desintegrina e metaloprotease com motivo de trombospondina 7B

(ADAMTS7B). Os genes infra-regulados incluíram moléculas de adesão neuronais (NCAM-140), fibronectina tipo III, proteína de interação com a proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WIP), CD74, molécula de adesão intercelular 2 (ICAM-2), Jagged1, integrina alfa-4 (Itga4), integrina BETA-7 (ITGB7), receptor de fator de transformação do crescimento tipo beta II (TGF-BII-R), proteína de indução precoce TGFb (TGFb IEP), linhagens mãe contra gene decapentaplégico (MAD) e a proteína SMA-4 de *C. elegans* (Smad4), receptor de proteína morfogenética óssea 1A (BMPR1A), CD83, Dectina-1, CD48, E-selectina, interleucina-15 (IL-15), supressor da sinalização de citocina 4, proteína relacionada ao receptor de citocina 4 (Cyt4) e receptor 1 de quimiocina (CX3CR1).

Um conjunto de genes comumente supra-regulado pelos dois tipos de tumores foi identificado, dos quais muitos estão conhecidamente envolvidos na regulação da angiogênese, incluindo o fator similar à relaxina (RLF) (Ho, R.L. *et al.* Immunological responses critical to the therapeutic effects of adriamycin plus interleukin 2 in C57BL/6 mice bearing syngeneic EL4 lymphoma, *Oncol Res*, 5:363-372 (1993)), a neurotrofina 5 (Lazarovici, P. *et al.*, Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane, *Endothelium*, 13:51-59 (2006)), a escramblase fosfolipídica (EndoLip) (Favre, C.J. *et al.*, Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285:H1917-1938 (2003)), a angiopoietina tipo 6, a semaforina VIb, Eph RA7, Eph RB2 e FGF13. Ainda, GM-CSF (Rapoport, A.P. *et al.*, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation, *Blood Rev*, 6:43-57 (1992)) que está associada à diferenciação e/ou à ativação de células mielóides, também supra-regulada em células CD11b+Gr1+ da medula óssea de camundongos portadores de tumores

resistentes. Diversos genes sabidamente envolvidos na ativação/geração de células dendríticas são totalmente infra-regulados em isolados CD11b+Gr1+ de tumores resistentes. Estas incluem, CD83, CD48, Crea7 e Dectina-1 (ver, por exemplo, Lechmann, M *et al.*, CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation, *Trends Immunol* 23:273-275 (2002)), IL-15 (veja, por exemplo, Feau, S. *et al.*, Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice, *Blood* 105:697-702 (2005)), e CX3CR1 (veja, por exemplo, Niess, J.H. *et al.*, CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance, *Science* 307:254-258 (2005)). Os dados moleculares estão de acordo com a análise multilinhagem das BMMNCs (**Fig. 15**), na qual se observa uma redução significativa ($p \leq 0,05$) da frequência de células CD11c+ tanto da medula óssea como de tumores em camundongos portadores de tumores resistentes. Além disso, diversos membros da superfamília TGF-beta (ver, por exemplo, Derynck, R *et al.*, TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression, *Nat Genet* 29:117-129 (2001)), incluindo Smad4 e BMPR1A, estão entre os genes infra-regulados, o que sugere um papel para a via TGF-beta na regulação da ativação/diferenciação de células CD11b+Gr1+ em camundongos portadores de tumores resistentes.

Além disso, a análise da expressão gênica de tumores LL2, EL4 e B16F1 foi conduzida e avaliada especificamente para genes supra ou infra-regulados em tumores resistentes ao tratamento com anti-VEGF (EL4+LL2), mas não em tumores sensíveis ao tratamento (B16F1). Os padrões gerais de expressão gênica foram distintos entre todos os tipos de tumores. Como mostrado na **Fig. 4d**, muitos dos genes cuja expressão mostrou-se diferente entre tumores sensíveis e resistentes ao anti-VEGF pertencem à classe de quimiocinas e citocinas, o que sugere a presença de células inflamatórias em tumores resistentes ao anti-VEGF. Ainda, diversos fatores pró ou anti-angiogênico foram identificados.

Da mesma forma, a análise adicional de expressão gênica em tumores TIB6, B16F1, EL4 e LLC tratados com anti-VEGF indica um perfil distinto de expressão gênica entre todos os tipos de tumores. Os genes supra-regulados incluíram fator de crescimento similar à insulina 2, proteína de ligação 3 (IGF2BP3), proteína de choque térmico 9A (HSP9A), fator de crescimento de fibroblasto 18 (FGF18), proteína relacionada ao fator de crescimento de tecido conjuntivo WISP-1 (ELM1), fator de crescimento derivado do epitélio da lente (Ldrgfa), receptor de resgate tipo A, lectina tipo C de macrófagos, precursor de receptor de imunoglobulina polimérica 3 precursor (Pigr3), receptor *scavenger* macrofágico tipo I (Macrophage SRT-1), receptor acoplado à proteína G, citocina pequena induzível A7 (ScyA7), receptor 2 de interleucina 1 (IL-1R2), proteína induzível de interleucina 1 (proteína induzível de IL-1), interleucina 1 beta (IL-1beta), LIX (quimiocina CXC induzida por LPS (Scyb5) gene quimiocina (motivo C-X-C) ligante 5). Os genes infra-regulados incluíram o fator beta de transformação do crescimento (TGF-B), Frizzled (FIZZ1), homólogo 1 da síndrome de Wolfram (Wfs1), proteína transmembrana 14A (TP 14A), proteína associada à matriz extracelular (EMAP), sulfatase 2 (SULF-2), matriz extracelular 2, fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTFG), inibidor da via de fator tecidual (TFPI), gene (XCP2) de proteína (Xcp2) da molécula alfa de mRNA semelhante à resistina linhagem C57BL/6 XCP2, proteína modificadora da atividade do receptor 2 (Ramp2), receptor órfão relacionado a RAR alfa (ROR-alfa), efrina B1, proteína secretada ácida e pura similar à cisteína 1 (SPARC-like 1) e semaforina A. A análise de genes expressos de modo diferencial (mais de 2 vezes, $p \leq 0,05$) em tumores resistentes *versus* sensíveis (TIB6+B16F1) identificou diversas citocinas sabidamente envolvidas na mobilização de BMMNCs no sangue periférico incluindo o fator estimulante da colônia de granulócitos (G-CSF) (ver, por exemplo, Rapoport, A.P. *et al.*, Granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrophil activation, *Blood Rev* 6:43-57 (1992)), e proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1) (ver, por exemplo, Leonard, E.J. *et al.*, Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by human mononuclear phagocytes, *Adv Exp Med Biol* 351:55-64 (1993)).

Além disso, fatores envolvidos no processo de inflamação como a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-2) (ver, por exemplo, Cook, D.N., The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis, *J Leukoc Biol*, 59:61-66 (1996)) e a IL-1R (ver, por exemplo, Dinarello, C.A., Blocking IL-1 in systemic inflammation, *J Exp Med*, 201:1355-1359 (2005)) foram encontrados entre os genes expressos de forma diferente. Sabe-se que a maior parte das citocinas acima, como a G-CSF, está envolvida na diferenciação (ver, por exemplo, McNiece, I.K. *et al.*, Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages, *Exp Hematol*, 19:226-231 (1991)) e na proliferação (ver, por exemplo, Lemoli, R.M. *et al.*, Proliferative response of human acute myeloid leukemia cells and normal marrow enriched progenitor cells to human recombinant growth factors IL-3, GM-CSF and G-CSF alone and in combination, *Leukemia*, 5:386-391 (1991)) de progenitores hematopoiéticos das células mielóides. Assim, além de estimular e promover a mobilização das células hematopoiéticas para a periferia é possível que os camundongos portadores de tumores resistentes compartilhem uma capacidade de estimulação da diferenciação de células mielóides.

Estas descobertas apóiam a conclusão sobre os estudos de expressão gênica de células CD11b+, Gr1+, e sugerem que a regulação diferencial de atividades pró ou anti-angiogênicas e quimiocinas e citocinas inflamatórias por tumores resistentes ao tratamento com anti-VEGF podem contribuir potencialmente na resistência de tumores resistentes ao anti-VEGF.

**A COMBINAÇÃO DE ANTI-VEGF COM AGENTES QUE INTERFEREM NAS FUNÇÕES DAS
CÉLULAS MIELÓIDES SUPRIME A ANGIOGÊNESE E O CRESCIMENTO TUMORAL.**

Um anticorpo anti-Gr1 que reduz o número de células mielóides Gr1+ na circulação periférica foi testado de modo isolado ou em combinação com anti-VEGF no contexto de tumores EL4 (**Figs. 5a-b**) e LL2 (**Figs. 5c-d**). Quando administrado isoladamente, o tratamento anti-Gr1 mostrou-se eficaz na redução do número de células Gr1+ periféricas e tumorais; entretanto, ele não conseguiu afetar o crescimento e a vascularização de tumores EL4 de modo significativo (**Figs. 5a-b**). Quando o anticorpo anti-Gr1 foi associado a G6-23, no entanto, foi observada uma tendência de atraso prolongado do crescimento tumoral e início da resistência tanto nos tumores EL4 (**Fig. 5b**) como LL2 (**Fig. 5d**) ao se comparar os efeitos induzidos pelo tratamento isolado com anti-VEGF e aqueles presentes nos grupos com combinação de tratamento. A análise histológica dos tumores LL2 revelou uma tendência de redução do número de células mielóides Gr1+ através das medidas de FACS e da área de superfície vascular (VSA), que mostraram correlação com uma redução das taxas de crescimento tumoral (**Figs. 5c e d**) no grupo com combinação de tratamento.

A análise da expressão gênica revelou um aumento significativo da expressão de elastase de neutrófilo nas células de tumor e CD11b Gr1+ de medula óssea em linhagens tumorais resistentes ao anti-VEGF (**Fig. 4b**). A elastase produzida por neutrófilos promove a proliferação, motilidade das células tumorais e estimula o crescimento de diversos tipos de tumor. Ver, por exemplo, Sun, Z. & Yang, P. Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol* 5:182-90 (2004). Além disso, propõe-se um papel para a elastase de neutrófilo na regulação da mobilização de neutrófilos e na angiogênese. Ver, por exemplo, Shamamian, P. *et al.* Activation of progelatinase A (MMP-2) by

neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol* 189:197-206 (2001). Um

tratamento com anti-VEGF foi associado ao uso de um inibidor da elastase. A combinação de tratamento levou a uma redução significativa dos volumes

5 tumorais e peso final dos tumores LLC e EL4 (**Figs. 5 e-f**). De modo semelhante ao tratamento com anticorpos anti-Gr1 (**Figs 5 a-d**), o inibidor da elastase induziu quase totalmente as células mielóides circulantes separadas, contudo, dentro dos tumores, houve uma redução de 2 a 3 vezes quando comparado ao tratamento controle. Com base nisto, os autores levantam a

10 hipótese de que algumas células progenitoras mielóides sem a expressão de CD11b ou Gr1 podem não ser afetadas pelo tratamento. Alternativamente, as células progenitoras podem apresentar um potencial de infiltração tumoral e se diferenciar em células mielóides *in situ*. Estratégias que induzam uma ablação

mais profunda de células mielóides em tumores submetidos a tratamento com
15 anti-VEGF podem ainda aumentar os efeitos terapêuticos da combinação de tratamento. Em conjunto, tais descobertas sugerem a melhor eficácia

terapêutica ao se associar o uso de anti-VEGF a compostos direcionados a funções das células mielóides e produzem uma primeira evidência de que as

20 desenvolvimento da resistência ao tratamento com anti-VEGF. Além disso, estas descobertas reforçam a noção de que diversas vias podem estar envolvidas com o recrutamento e ativação de células mielóides em direção aos tumores resistentes ao anti-VEGF.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE CD11B+GR1+ EM TUMORES RESISTENTES

25 Com base em características funcionais distintas das células CD11b+Gr1+ em tumores resistentes, suas propriedades celulares foram investigadas. A expressão de moléculas sabidamente envolvidas na mobilização (CXCR4 (ver, por exemplo, Orimo, A. *et al.*, Stromal fibroblasts

present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion, *Cell*, 121:335-348 (2005))) e na migração transendotelial (L-Selectina (ver, por exemplo, Simon, S.I. *et al.*, L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin, *J Immunol*, 155:1502-1514 (1995))) de células hematopoiéticas foram examinadas. Além disso, as TAMs, conhecidas pela expressão de F480, têm sido descritas como um subgrupo de células mielóides com potencial de aumentar o crescimento tumoral (ver, por exemplo, Luo, Y. *et al.*, Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer, *J Clin Invest*, 116:2132-2141 (2006))). A depleção de TAMs, usando-se clodronato, aumentou a eficácia do tratamento com anti-VEGF em camundongos portadores de tumores resistentes. Ainda, foi possível localizar TAMs positivas para Tie2 em vasos tumorais, mediadoras da angiogênese (ver, por exemplo, De Palma, M. *et al.*, Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors, *Cancer Cell*, 8:211-226 (2005))). Dessa forma, foi investigada a expressão de CXCR4, L-Selectina, F4/80 e Tie-2 na fração mielóide em tumores sensíveis e resistentes tratados com anti-VEGF.

Camundongos C57BL/6 (n=5) receberam implantes de tumores TIB6, B16F1, EL4 e LLC e foram tratados com anti-VEGF ou anticorpos controle, conforme descrito. Os isolados tumorais de cada camundongo foram coletados após 17 dias e corados com anticorpos contra CD11b, Gr1, CXCR4, F480, L-Selectina e Tie2. Foi observada uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) na expressão dos subgrupos CXCR4, F480, L-Selectina e Tie2 em comparação a células CD11b+Gr1+ em camundongos portadores de tumores resistentes *versus* seus correspondentes sensíveis. As BMMNCs foram isoladas de camundongos portadores de tumor e coradas com os mesmos marcadores,

como descrito acima. Consistente com a análise tumoral, houve uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) na frequência dos subgrupos CXCR4, F480, L-Selectina e Tie2 em células GFP+CD11b+Gr1+ de tumores resistentes *versus* população correspondente em tumores sensíveis.

5 A análise de citometria de fluxo revelou que as células CD11b+Gr1+ de tumores resistentes estão altamente aprimoradas ($p \leq 0,05$) para expressão de CXCR4, F480, L-Selectina e Tie2. Um quadro semelhante obtido de células de medula óssea CD11b+Gr1+ isoladas de camundongos com tumor foi analisado. Estas observações sugerem que as células
10 CD11b+Gr1+ em tumores resistentes apresentam mobilização mais potente, migração transendotelial e deslocamento em direção aos tumores.

MECANISMOS DISTINTOS GOVERNAM A RESISTÊNCIA AO ANTI-VEGF E AGENTES

QUIMIOTERÁPICOS

Ao se analisar os mecanismos celulares de resistência ao anti-
15 VEGF surge a questão da possibilidade das células mielóides também mediar a resistência a outros compostos anti-câncer. No entanto, nós investigamos a resistência a dois agentes quimioterápicos comumente usados, incluindo 5-Fluor uracil (5FU) e Gencitabina (ver, por exemplo, Pasetto, L.M. *et al.*, Old and new drugs in systemic therapy of pancreatic cancer, *Crit Rev Oncol Hematol*, 49:135-151 (2004)). Tumores resistentes e sensíveis ao anti-VEGF
20 exibiram respostas diferentes à quimioterapia. Como mostrado na Figura 18 a & b, ambos os tumores resistentes ao anti-VEGF, isto é, EL4 e LLC, mostraram uma resposta completa ao 5FU e uma resistência parcial à Gencitabina em períodos posterior, o que é muito menor do que a resistência ao tratamento
25 com anti-VEGF. Em linhagens celulares sensíveis ao anti-VEGF, foram encontrados tumores TIB6 completamente sensíveis aos compostos, sem diferença significativa comparada à resposta ao tratamento com anti-VEGF (Fig. 18c). No entanto, tumores B16F1 mostraram resistência tanto ao 5FU

como à Gencitabina, comparado ao tratamento com anti-VEGF (**Fig. 18d**). Portanto, os dados indicam claramente que o perfil de resistência ao anti-VEGF não corresponde à quimioterapia na resistência e sensibilidade dos tumores, e sugerem que os diferentes mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da resistência na abordagem anti-angiogênica *versus* agentes quimioterápicos. A análise de células BM mostraram completa exaustão de células CD11b+Gr1+ em todos os camundongos tratados com 5FU e em grau menor nos animais tratados com Gencitabina (**Fig. 6e**). No entanto, a falta de células CD11b+Gr1+ em tumores B16F1 tratados com Gemcitabina ou 5FU (**Fig. 6f**) minimiza o envolvimento de células mielóides no desenvolvimento da resistência à quimioterapia.

O recrutamento de células CD11b+Gr1+ para os tumores primários representa um mecanismo celular mediador de resistência ao tratamento com anti-VEGF dentro de um subgrupo de tumores experimentais em camundongos. O perfil de expressão gênica permitiu a identificação de um conjunto de genes que são regulados de forma distinta nas células CD11b+Gr1+ na medula óssea de camundongos portadores de tumores resistentes ao anti-VEGF, em comparação a tumores sensíveis ao anti-VEGF. Entre eles, foram encontrados diversos fatores pró ou anti-angiogênico, além de marcadores de ativação de células mielóides que se tornam supra-regulados durante a preparação do tumor. O recrutamento de células mielóides para tumores está envolvido no desenvolvimento de resistência à droga e representa uma das etapas iniciais na cascata de eventos. Compostos dirigidos a fatores derivados de tumor que regulam o recrutamento e/ou ativação de células mielóides pode ser combinado com compostos anti-angiogênicos. O bloqueio seletivo de quimioatrativos derivados de tumor para células mielóides pode ser vantajoso quando comparado a uma ablação de célula mielóide sistêmica, por exemplo, para evitar potenciais complicações de

supressão sistêmica prolongada de partes do sistema imune inato (ver, por exemplo, Lewis, C.E. & Pollard, J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* 66:605-612 (2006)). Antagonistas de fatores pró-angiogênicos secretados por células mielóides infiltrativas de tumor podem ser usados em combinação de tratamento com compostos anti-VEGF. Fatores de direcionamento que regulam funções específicas de células mielóides podem afetar indiretamente a angiogênese no tumor e reduzir a resistência do tumor à terapia com anti-VEGF. Ver Fig. 5.

A avaliação clínica do bevacizumabe, anticorpo monoclonal anti-VEGF mostrou atividade significativa como agente único em vários cânceres humanos, incluindo carcinomas renal e ovariano (ver, por exemplo, Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. & Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3:391-400 (2004); e Jain, R.K., Duda, D.G., Clark, J.W. & Loeffler, J.S. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Rev Cancer Oncol* 3:24:00-40 (2006)). Durante o amplo desenvolvimento clínico de bevacizumabe na maioria dos tipos tumorais, tornou-se aparente que em muitos tumores, os efeitos terapêuticos fortes foram obtidos em combinação com agentes quimioterápicos. A natureza do delineamento molecular e dos eventos celulares que levam ao aumento dos benefícios terapêuticos na combinação de tratamento com compostos citotóxicos estão sob análise. Foi proposto que o aumento do consumo da droga contra o tumor tem como consequência a normalização dos vasos (revisado por Jain *et al.* em Jain, R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 7:987-9 (2001)) e/ou a interferência na recuperação de células endoteliais seguindo danos citotóxicos da vasculatura dos tumores (revisão em Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. & Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating

cancer. Nat Rev Drug Discov 3:391-400 (2004)) e pode contar com o aumento dos benefícios terapêuticos (revisão em Ferrara & Kerbel in Ferrara, N. & Kerbel, R.S., Angiogenesis as a therapeutic target. Nature 438:967-74 (2005)). Sem se ater a uma única teoria, a identificação de um papel para as células mielóides no mecanismo que leva à resistência ao tratamento com anti-VEGF fornece, ainda, suporte para a noção de que efeitos mielosupressivos associados com a maioria dos compostos citotóxicos podem contribuir para a inibição do crescimento tumoral. Observou-se que a redução no número de células mielóides nos tumores primários de pulmão em pacientes tratados com quimioterapia foram correlacionados com a sobrevida (ver, por exemplo, Di Maio, M. *et al.* Chemotherapy-induced neutropenia and treatment efficacy in advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of three randomised trials. Lancet Oncol 6:669-77 (2005))).

A análise de arranjo de DNA de células CD11b+Gr1+ identificou alterações na expressão gênica, as quais são distintas nos tumores resistentes e sensíveis ao anti-VEGF, demonstrando uma troca de informação paralela distinta entre tumores desenvolvidos no flanco de camundongos e um subconjunto de células da medula óssea (**Fig. 4a**).

EXEMPLO 2

FATORES ADICIONAIS DE MODELOS DE TUMOR RESISTENTES AO TRATAMENTO COM ANTI-VEGF

Fatores adicionais de tumores que podem, direta ou indiretamente, apoiar ou fornecer resistência aos tumores, foram identificados. Lisados de tumores de linfoma de camundongos resistentes ao tratamento com anti-VEGF (por exemplo, EL4 e L1210) foram tratados com anticorpo anti-VEGF (G6-31) com 5 mg/kg/semana, duas vezes/semana por 2 semanas. Após tratamento, os tumores agrupados e homogeneizados com 6 mL de tampão RIPA 2X com inibidores de protease (Roche). A homogeneização foi

centrifugada 2x por 15 minutos a 14.000 rpm em centrífuga eppendorf. O sobrenadante foi diluído a 1:1 em 20 mM de Tris, pH 7,5, 50 mM de NaCl e aplicado a 1 mL de HiTrap HS. A coluna foi lavada com tampão inicial (20 mM de Tris, pH 7,5, 50 mM de NaCl) e então eluído com cerca de 5 colunas de volume com aumento passo a passo nas concentrações de NaCl (0,25M de NaCl, 0,5 M de NaCl, 1 M de NaCl, e 3 M de NaCl). As frações de pico em cada etapa foram coletadas. Ver **Fig. 8**.

Diversos fatores foram encontrados nas altas frações salinas de EL4 e L1210 que contribuem para a atividade quimiotática (por exemplo, pelo teste de migração de monócito) ou um teste de proliferação (por exemplo, teste de proliferação de HUVEC). Por exemplo, bFGF foi encontrado na alta fração salina e mostrou contribuir para a proliferação de células HUVEC em um teste de proliferação de células HUVEC, mas não em um teste de atividade quimiotática em um teste de migração de monócito. Outros fatores encontrados na alta fração salina mostraram ter atividade quimiotática em direção a monócitos.

Usando-se uma combinação de um agente que reduz/depleta macrófagos e um tratamento com anti-VEGF (G6-23) em tumores (EL4) resistentes ao tratamento com anti-VEGF, a combinação atrasou o crescimento tumoral. Tumor EL4 em camundongos foram tratados com 1) lipossomo/erva-de-santiago em PBS, 2) lipossomo/G6-31 em PBS; 3) lipossomo de clodronato/G6-23, 4) lipossomo de clodronato/G6-31 ou 5) lipossomo de clodronato/PBS na veia da cauda. **Fig. 9** mostra a alteração no volume do tumor EL4 (medido por calibre) 72 horas após a última dose. Há uma redução no volume do tumor em camundongos tratados com lipossomos de clodronato, agente de depleção de macrófago e anti-VEGF (G6-23). Houve também uma redução dos macrófagos detectados no sangue de animais tratados com lipossomo de clodronato/anti-VEGF. Ver abaixo da **Fig. 9**. Lipossomos de clodronato

também diminuíram a expressão do VEGF, conforme medido por PCR (Taqman) em tempo real, quando administrados aos camundongos em combinação com anti-VEGF (G6-23). Ver Fig. 10. A expressão da proteína KC (CXCL1) também diminuiu, conforme medido por ELISA (RD Systems), em camundongos tratados com lipossomos de clodronato e anti-VEGF (G6-23), conforme descrito acima. Ver Fig. 11. KC (CXCL1) é uma proteína identificada por sua super-expressão em monócitos e macrófagos murinos. Sua síntese é induzida por TNF alfa. KC está envolvida na quimiotaxia/ativação de neutrófilos e captura de monócitos na superfície do endotélio. A síntese de KC nas células endoteliais vasculares é induzida pela trombina. O receptor de KC e receptor de B tipo and IL-8 são homólogos. O receptor é capaz de se ligar tanto a KC como a MIP-2 (proteína-2 inflamatória de macrófago). KC é secretada tanto por linhagens de células tumorais sensíveis ao tratamento com anti-VEGF como por linhagens de células tumorais resistentes ao tratamento com anti-VEGF.

Outras citocinas pró-inflamatórias foram encontradas na alta fração salina de linhagens de células tumorais resistentes, por exemplo, MIP-1alfa, MCP-1, IL-1alfa, IL-1beta, IL-7, IL-9, IL-10 e IL-13. MCP-1 é uma proteína-1 quimioatrativa de monócito (CCL2 ou JE), e é secretada por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Ela é induzida por M-CSF, IL-1, IFNgama e TGF beta. MIP-1 alfa é proteína-1a inflamatória de macrófago (CCL3) e é secretada por macrófagos em resposta a inflamação local e ativa neutrófilos para produzir superóxido. É também secretada por linfócitos e monócitos. Em um modelo de carcinogênese hepatocelular de camundongo, MIP-1alfa e MCP-1 são secretadas por vasos novos e estimulam a proliferação através de seus receptores de modo autócrino. Ver, por exemplo, *Cancer Res.* 66(1):198-211 (2006). Tanto MCP-1 como MIP-1 alfa são expressas em linhagens celulares tumorais resistentes ao tratamento com

anti-VEGF. Ver **Fig. 12, Paine**l A e B, onde Dil(+) são células endoteliais, CD3(+) representa células linfoides e F4/80(+) representa macrófagos. Dil significa Dil-Ac-LDL (lipoproteína acetilada de baixa densidade marcada com 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindo-carbocianina perclorato (Dil) (Biomedical Technologies Inc). Qualquer célula endotelial tem a capacidade de absorver este corante.

Descobriu-se que MIP-1 alfa e MCP-1 têm atividade angiogênica em teste de brotamento angiogênico e formação do lúmen capilar. Ver **Fig. 13, Paine**l A e Paine

l B no dia 10. Nos testes, células HUVEC foram descongeladas em baixo número de passagem um dia antes das células serem revestidas com esferas. As células foram separadas com cerca de 80% de confluência e revestidas em microesferas citodex (uma matriz de reticulação de dextrano) com HUVEC (400 células/esfera) por 4 horas a 37°C. As esferas e as células HUVEC livres foram transferidas para um frasco e cultivadas de um dia para o outro. As esferas foram separadas e misturadas com fibrinogênio (plasma bovino) (250 µg/mL). O fibrinogênio foi então convertido em gel de fibrina insolúvel pela adição de trombina. Foram colocadas cerca de 100 esferas/placa com 12 poços. As esferas foram cultivadas com 40.000 D551 fibroblastos e VEGF como controles positivos, D551 ou VEGF como controles negativos, MCP-1 e D551, ou MIP-1 alfa e D551. O meio foi trocado todos os dias. As culturas foram coradas com estreptavidina anti-humana CD31 e Cy3 biotinilada de um dia para o outro com lavagens intensas. As fotografias foram tiradas em 60 horas, 6 dias e 10 dias.

TESTE DE MIGRAÇÃO DE MONÓCITO

Etapa 1: isolamento de monócito de PBMC humano. O sangue foi diluído com PBS 1:1 (v/v). O sangue diluído foi lentamente adicionado na parte superior da Ficoll e centrifugado a 3000rpm por 15 minutos em temperatura ambiente (RT) sem intervalo. O plasma foi removido e os glóbulos brancos

foram coletados (9~5 mL interfase). As células foram lavadas em tampão de migração contendo PBS com 0,5% de BSA (baixo em endotoxina), em rotação a 1850rpm (9~800g) por 10 minutos a RT e as células foram contadas. Etapa 2: Marcação magnética de células. O *pellet* de célula foi resuspenso em tampão

5 MACS contendo PBS com 0,5% de BSA (baixo em endotoxina) e 2mM de EDTA, 30µl por 10^7 células. O reagente de bloqueio FcR e coquetéis de anticorpo com biotina foram adicionados e bem misturados. As células foram então incubadas por 10 minutos a 4°C, foi adicionado a 30µl mais tampão MACS por 10^7 células, e as

10 Microesferas anti-biotina foram adicionadas. Isto foi bem misturado e incubado por 10 minutos a 4°C. As células foram lavadas com tampão MACS pela adição de 10-20 vezes mais do volume daquelas marcadas, centrifugadas a 300g (1250rpm) por 10 minutos. As células foram resuspensas até 10^8 células em 2 mL de tampão.

15 Etapa 3: Separação magnética com colunas LS. Coluna LS (Miltenty Biotec) foi colocada no detentor de campo magnético. A coluna foi enxaguada com tampão MACS. A suspensão celular foi aplicada à coluna. O fluxo não marcado foi coletado, o que representa a fração de monócito enriquecido. A coluna foi lavada com tampão 3 vezes, o fluxo foi coletado e combinado. Isto foi então centrifugado a

20 300g (1250 rpm) por 5 minutos. Etapa 4: Lavagem de células e meio de migração contendo RPMI com 0,5% de BSA (baixo em endotoxina) mais 2mM de L-glutamina e antibióticos. 10^6 células foram adicionadas em placas Transwell com 24 poços e tamanho de poro de 5 micrômetros (Corning). As câmaras externas, vários fatores de crescimento, citocinas/quimiocinas ou outras amostras de testes foram adicionadas. Após 2,5h a 37°C, o filtro foi cuidadosamente removido e as células foram misturadas muito bem e transferidas para uma solução de 10 mL de ZPAK

25 para contagem.

TESTE DE PROLIFERAÇÃO DE HUVEC

HUVEC com passagem menor que 8 foram usadas no estudo. Dia 1: 3000 células/poço (placa com 96 poços) foram plaqueadas em placas

revestidas com gelatina a 1% no meio de teste (DMEM:F12 50:50) com 1,5% de FBS. Dia 2: O meio foi trocado e as células foram tratadas com vários fatores de crescimento ou com meio condicionado. Dia 3: ^3H -timidina foi adicionada a 0,5 $\mu\text{Ci/poço}$. Dia 4: 250 mM de EDTA/poço foram adicionados para interromper a reação de manhã. As células foram colhidas em placas com filtro de 96 poços e lavadas com água, 3 vezes. As amostras ^3H foram contadas com medidor de cintilações líquida TOPCOUNT.

TRATAMENTO *IN VIVO* PARA EXAMINAR A DEPLEÇÃO DE MACRÓFAGOS E EXPRESSÃO

TUMORAL

EL4, a linhagem celular de linfócito murino foi utilizada. O tratamento iniciou 48 horas após a implantação de células tumorais EL4 (5×10^6 , vol. 0,1 mL em matrigel) em camundongos nus. O tratamento ocorreu como a seguir: Grupo 1: 8 camundongos, duas vezes por semana 200 μl de lipossomo em PBS IV e 100 μl ip com 2x5 mg/kg/semana de IgG de Erva de Santiago; Grupo 2: 8 camundongos, duas vezes por semana: 200 μl de lipossomo em PBS IV e 100 μl ip de G6-31 em 2x5 mg/kg/semana; Grupo 3: 8 camundongos, duas vezes por semana: 200 μl IV de lipossomo de clodronato. 100 μl ip com 2x5 mg/kg/semana de IgG de Erva de Santiago; Grupo 4: 8 camundongos, duas vezes por semana: 200 μl IV de lipossomo de clodronato. 100 μl ip com 2x5 mg/kg/semana de G6-31. Grupo 5: 8 camundongos, duas vezes por semana: 200 μl IV de lipossomo de clodronato. PBS duas vezes por semana 100 μl ip. 3 camundongos de cada grupo foram pré-sangrados para 50 μl de sangue total para avaliação de população celular de macrófago por FACS. 3 camundongos de cada grupo foram sangrados (ótico) para 100 μl de sangue total em 1 hora após cada injeção de lipossomo de PBS e de clodronato para análise FACS. O estudo continuou até o crescimento suficiente dos tumores (não mais que 5 semanas). O crescimento do tumor foi definido como suficiente quando o tumor tinha mais que 20 mm de

comprimento. O tamanho do tumor foi medido semanalmente (l x w x h). Os animais foram observados pelo menos duas vezes por semana. No final do experimento os animais foram sacrificados, os tumores foram medidos no período final e então extraídos, pesados e depois fixados. Sangue, baço e fígado foram retirados dos animais para posterior análise, por exemplo, análise FACS, análise de RNA, etc.

**DETECÇÃO DA POPULAÇÃO DE MACRÓFAGOS NO SANGUE, BAÇO E FÍGADO COMO
UMA INDICAÇÃO DE DEPLEÇÃO DE MACRÓFAGO**

Após 92 h da primeira injeção i.v. de lipossomos de clodronato, foi administrado CO₂ para matar os camundongos (camundongos FV6 transgênicos vs camundongos XID nus bege) (2 camundongos FV6 tratados com clodronato e 2 camundongos XID nus bege tratados com clodronato, um camundongo XID nu bege não tratado) e 150µl de sangue da cavidade cardíaca foi coletado e colocado em tubos contendo heparina, e armazenados em temperatura ambiente. O sangue foi processado por: 1) retirada de 150µl de amostra de sangue e adição de 1 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos ACK (Biosource P304-100); 2) lise por 5 minutos. em temperatura ambiente, 3) rotação a 5000 rpm em temperatura ambiente por 2 minutos; 4) lavagem com tampão FACS (PBS + 2% FCS) e nova rotação; e, 5) ressuspensão em 60µl de tampão FACS e filtração através de malha de 70 µm. O sangue foi processado por: 1) preparação de suspensão única de células usando-se lâminas de vidro com superfície congelada (VWR micro lâminas 48312-002, 25 X 75mm) em tampão FACS; 2) centrifugação a 1200 rpm por 5min; 3) suspensão do *pellet* com 5 mL de ACK (tampão ACK: 0,15 M de NH₄Cl, 10,0mM de KHCO₃, 0,1 mM de Na₂ EDTA, pH a 7,2-7,4, filtração esterilizada através de 0,22 µm e armazenamento em temperatura ambiente) e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos ou mais, opcionalmente com agitação adicional; 4) após incubação, adição de meio FACS a 15 mL; 5)

nova centrifugação e ressuspensão das células em 0,5-1 mL de tampão FACS (1 mL para camundongos FV6, 0,5 mL para camundongos XID nus bege); e 6) filtração. O fígado foi processado por: 1) corte do fígado (1/8 de pedaço completo) em pequenos pedaços em tampão FACS (em tubos cônicos de 50 mL) e lavagem dos pedaços com 45 mL de PBS; 2) centrifugação dos pedaços a 1200 rpm por 5 minutos e movimentação cuidadosa dos pequenos pedaços em superfície congelada para produzir células únicas; 3) lavagem com 3 mL de tampão FACS e centrifugação; e 4) ressuspensão em 0,5 mL de tampão FACS e filtração. 10 µl de glóbulos vermelhos foram diluídos em 90µl de tampão FACS para o total da contagem de células. Para o total da contagem, uma amostra do baço foi tirada e diluída a 1:10. 50µl da amostra de sangue, baço e fígado foram colocadas em agrupamentos de cultura celular com 96 poços, V-base com lid (Costar 3894) e anticorpo de bloqueio (CD16/32) foi adicionado a 1µl/amostra por 15 minutos. As células foram então incubadas com anticorpo F4/80-PE, 10 µl/amostra; (Serotec, F4/80 de rato anti-camundongo, MCA497PE, 1101B) para detectar macrófagos. As células foram então incubadas com anticorpo no gelo por 20 minutos cobertas com papel alumínio, e em seguida 200µl de tampão FACS foi adicionado, e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 4°C, 1500 rpm. O tampão foi removido e as células foram resuspensas usando-se 200µl de tampão FACS e foram novamente centrifugadas. As células finalmente foram resuspensas em 130µl de tampão FACS, transferidas para tubos menores (202032202-12) e lidas no dispositivo BD FACS.

PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO CELULAR ÚNICA A PARTIR DE AMOSTRAS DE TUMOR

O tumor foi dissecado para remoção do tecido adiposo e da pele, colocado em meio EL4 contendo PSGF, e então colocado no gelo; os tumores foram lavados com o mesmo meio pela adição de 15 mL/tumor e centrifugados a 180 rpm por 10 minutos; os sobrenadantes foram removidos e o tecido foi

novamente lavado; e os tumores foram moídos em pequenos pedaços (< 1mm) em 2 mL de meio frio EL4 usando-se 10 cm de placas de cultura de tecido. Células únicas do tumor EL4 foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL pela adição de 8 mL de meio e filtradas através de filtro com malha de nylon com 40 μm ; 50 mL do tampão de dissociação celular/tumor contendo collagenase IV, DNase e elastase foi adicionado às células por 1,5 hora a 37°C usando-se 2 placas de Petri de 10 cm. O tecido foi rompido com pipeta, para cima e para baixo, a cada 15 minutos. Opcionalmente, 12,5 mL de tampão de dissociação celular contendo Liberase Blendyme pode ser adicionado, por exemplo, 200 μl em 12,5 mL após meia hora, juntamente com collagenase IV após 1h. O tecido digerido foi sequencialmente filtrado através de filtro com malha de nylon de diferentes tamanhos (100, 70 e 40 μm) e as amostras foram lavadas duas vezes com meio EL4 e centrifugadas a 4°C a 2000 rpm/minuto por 5 minutos. As células foram contadas e coletadas. Em um experimento, as células foram lisadas e o RNA total foi isolado (por exemplo, que podem ser analisadas por Taqman). Opcionalmente, as células foram suspensas até 1.000.000 células/100 μl usando-se meio EL4 (1,4 mL); para 1.000.000 células, as células foram bloqueadas com 2 μg FcI/II por 30 minutos e marcadas por 1 hora em temperatura ambiente com F4/80, anticorpo CD3 ou anticorpos CD31 marcados para isolar macrófagos, linfócitos EL4 e outras células hematopoiéticas e células endoteliais da amostra; as células foram lavadas duas vezes com meio EL4, suspensas em 1.000.000 células/0,5mL para seleção celular. As células foram aprisionadas com base em FSC/SSC e intensidade fluorescente. As células selecionadas também foram centrifugadas, cultivadas em meio de cultura adequado, contadas e medidas para viabilidade celular. As células podem ser preparadas para estudos de morfologia/imunofluorescência por plaqueamento e células usando-se meio EL4 em câmaras de placas de cultura celular de 4 poços, revestidas com

gelatina a 1% ou revestidas com Matrigel (30 minutos) e cultivadas de um dia para o outro. As células podem ser desprendidas e lisadas (< 500.000 células) para isolados de RNA. Opcionalmente, outros tipos celulares, por exemplo, fibroblastos, miócitos, etc. podem ser isolados do dispositivo de seleção, 5 contados, medidos para viabilidade celular e posterior análise. Opcionalmente, estas células podem ser lisados e isolados de RNA.

PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE LIPOSSOMOS DE CLODRONATO

75-95 mg de L-alfa-fosfatidilcolina foram adicionados em um frasco de 500 mL (que foi previamente enxaguado com metanol e clorofórmio) 10 com 10 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio. Foram adicionados 10-15 mg de colesterol. O frasco foi colocado em Rotovapor com rotação (130-150 rpm) e baixo vácuo (gradualmente reduzido de 200 mbar para 150 mbar (20 kPa para 15 kPa)) a 37°C em banho-maria até a dissolução do líquido e formação de filme, por cerca de 10 minutos. O filme foi dissolvido em 10 mL de 15 clorofórmio e colocado sob rotovapor novamente para remover o clorofórmio, e fosfolipídeos na cor branco leitoso se formaram na superfície interna da parede do frasco, por cerca de 15 minutos. Em alguns casos, o filme não se formou apesar do líquido ter evaporado. O filme fosfolipídico foi disperso em 10 mL de PBS ou 2,0 g de clodronato / 10 mL de PBS e girados manualmente ou 20 agitados até a dissolução do filme, no qual uma suspensão na cor branco leitoso foi formada. A suspensão na cor branca leitosa foi mantida em temperatura ambiente 1,5-2 horas com gás N₂. A suspensão foi gentilmente agitada e sonicada em sonicador em banho-maria por 3 minutos. A suspensão foi mantida com gás N₂ por 2 horas em temperatura ambiente ou de um dia 25 para o outro a 4°C para crescimento dos lipossomos. Clodronato não encapsulado foi removido por centrifugação dos lipossomos 10.000 X g, por 15 minutos, a 16°C (11.600 rpm 70 Ti rotor). Os lipossomos formaram uma banda branca no topo da suspensão. A solução de clodronato debaixo dos

lipossomos foi removida usando-se uma pipeta. Os lipossomos foram lavados 2 a 3 vezes com solução estéril de PBS e agitados manualmente para romper o *pellet*. Os lipossomos foram então centrifugados a 25.000 X g, por 30 minutos, a 16°C (18.400 rpm usando-se 70 Ti rotor). O *pellet* foi ressuspenso em 4 mL de PBS estéril e armazenado até 4 semanas com N₂ em PBS, até 4 semanas. Antes da administração aos animais, os lipossomos foram cuidadosamente agitados e 200 µL do lipossomo reagente foi administrado para cada animal via veia da cauda, duas vezes por semana.

A especificação é considerada suficiente para permitir a um técnico no assunto praticar a invenção. Várias modificações da invenção, além daquelas mostradas e descritas no presente pedido, serão aparentes para aqueles técnicos no assunto da descrição anterior e se incluem dentro do escopo das reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados no presente pedido são integralmente incorporados ao presente como referência para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE UM ANTAGONISTA DO VEGF, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratar um tumor resistente em um sujeito, em que o tratamento compreende a administração de quantidades eficazes do antagonista do VEGF e um agente de redução de célula mieloide.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tratamento compreende ainda a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de um agente quimioterápico.

3. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o agente de redução de célula mielóide compreende um antagonista de CD11b, um antagonista de CD18, um antagonista de Gr1, um inibidor da elastase, um antagonista de MCP-1 ou um antagonista de MIP-1 alfa.

4. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o antagonista é um anticorpo anti-VEGF.

5. USO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o antagonista é um anticorpo.

6. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o antagonista do VEGF é um anticorpo anti-VEGF e o agente de redução de célula mielóide é um anticorpo anti-CD11b.

7. USO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o agente quimioterápico é 5FU ou gencitabina.

8. MÉTODO *IN VITRO* PARA DIAGNOSTICAR UM TUMOR RESISTENTE, em um sujeito, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

- fornecer, a partir do sujeito, uma população de células para teste de um tumor do sujeito;

- medir o número ou a porcentagem de células CD11b+Gr1+ na população de células de teste;

- comparar o número ou porcentagem de células CD11b+Gr1+ na população de células de teste com o número ou porcentagem das células CD11b+Gr1+ em uma população de células de referência; e

- detectar um aumento no número ou na porcentagem de células CD11b+Gr1+ na população de células de teste em comparação à população de células de referência, em que o aumento no número ou porcentagem de células CD11b+Gr1+ indica que o tumor é o tumor resistente.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, medir o tamanho do baço do sujeito e comparar o tamanho do baço do sujeito com um tamanho de baço de referência, em que o aumento do tamanho do baço indica que o tumor é o tumor resistente.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende, ainda, medir o número ou porcentagem de uma área de superfície vascular (VSA) de um tumor no sujeito, após ter sido administrado ao sujeito um antagonista do VEGF, e comparar o número ou porcentagem da VSA do tumor com uma VSA de referência, em que um aumento no número ou porcentagem da VSA do tumor indica que o tumor é o tumor resistente.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o antagonista do VEGF é um anticorpo anti-VEGF.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende:

- fornecer, a partir do sujeito, uma população de células para teste de um tumor do sujeito;

- medir o número ou a porcentagem de células B linfoides CD19 ou

células dendríticas CD11c na população de células de teste;

- comparar o número ou percentagem das células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste com o número ou percentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c e uma população de células de referência; e

- detectar uma diminuição no número ou na percentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste em comparação à população de células de referência, em que a diminuição no número ou percentagem de células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c indica que o tumor é o tumor resistente.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende:

- fornecer, a partir do sujeito, uma população de células para teste de uma medula óssea do sujeito;

- medir o número ou percentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste;

- comparar o número ou percentagem das células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste com o número ou percentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de referência; e

- detectar uma diminuição no número ou na percentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c na população de células de teste em comparação à população de células de referência, em que a diminuição no número ou percentagem de células T linfoides CD90, células B linfoides CD19 ou células dendríticas CD11c indica que o tumor é o tumor resistente.

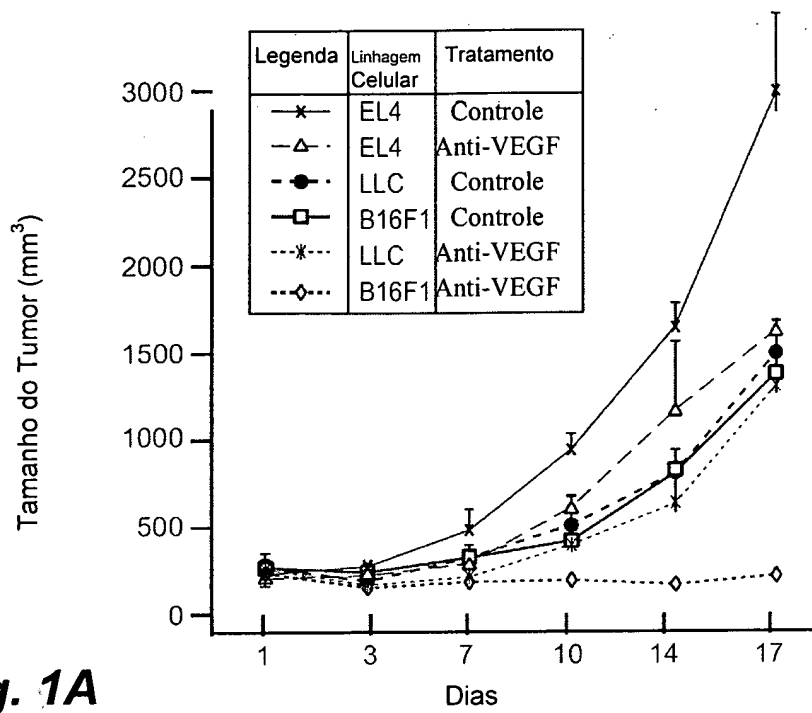


Fig. 1A

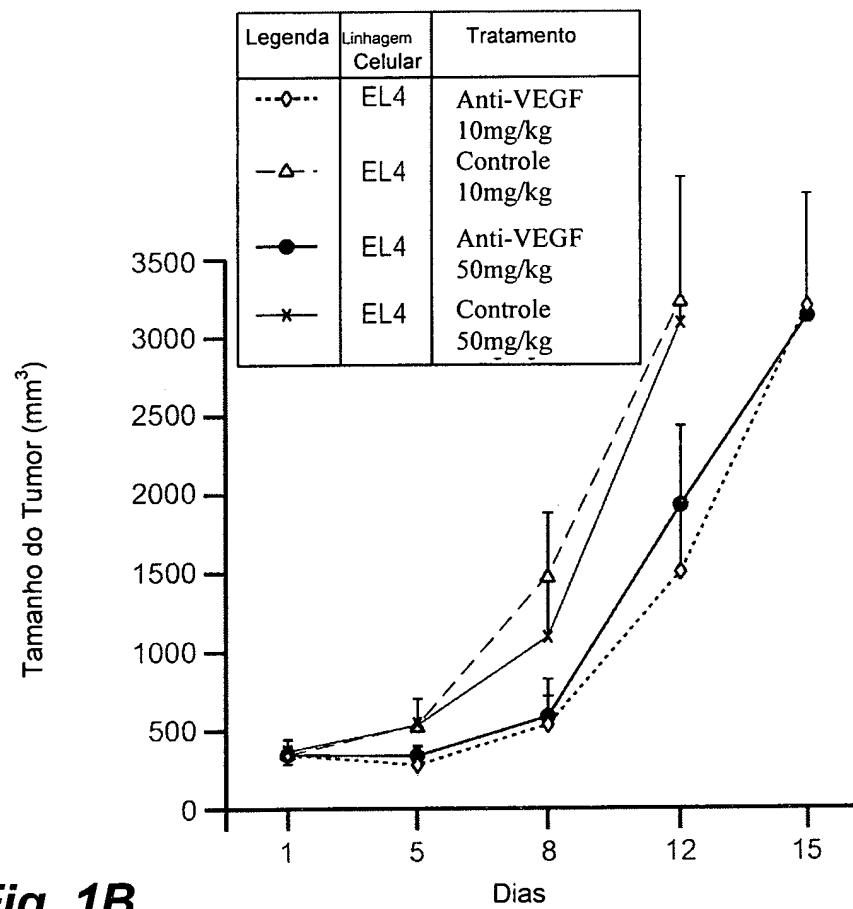


Fig. 1B

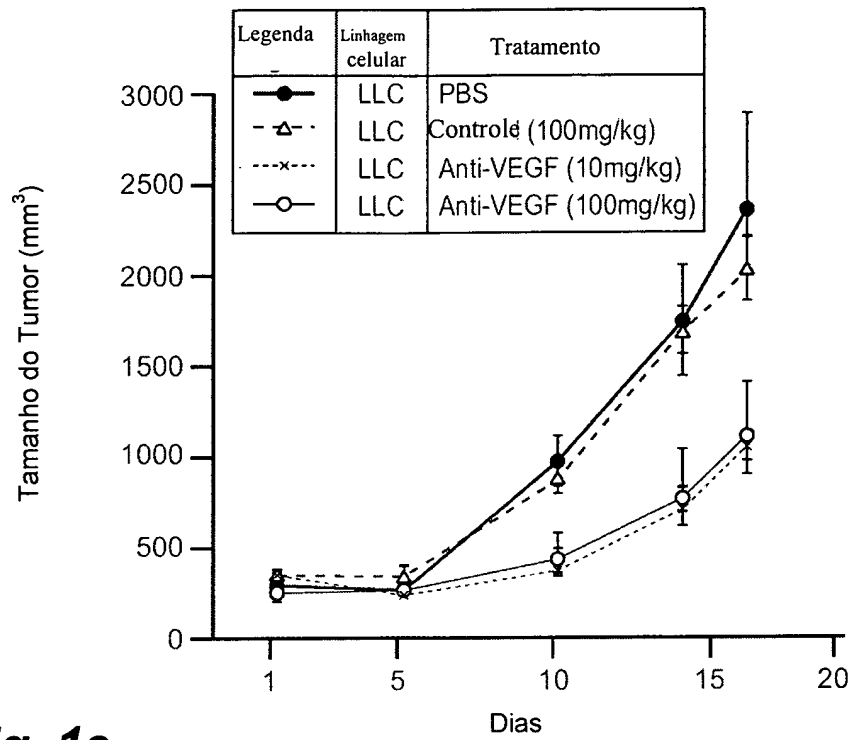


Fig. 1c

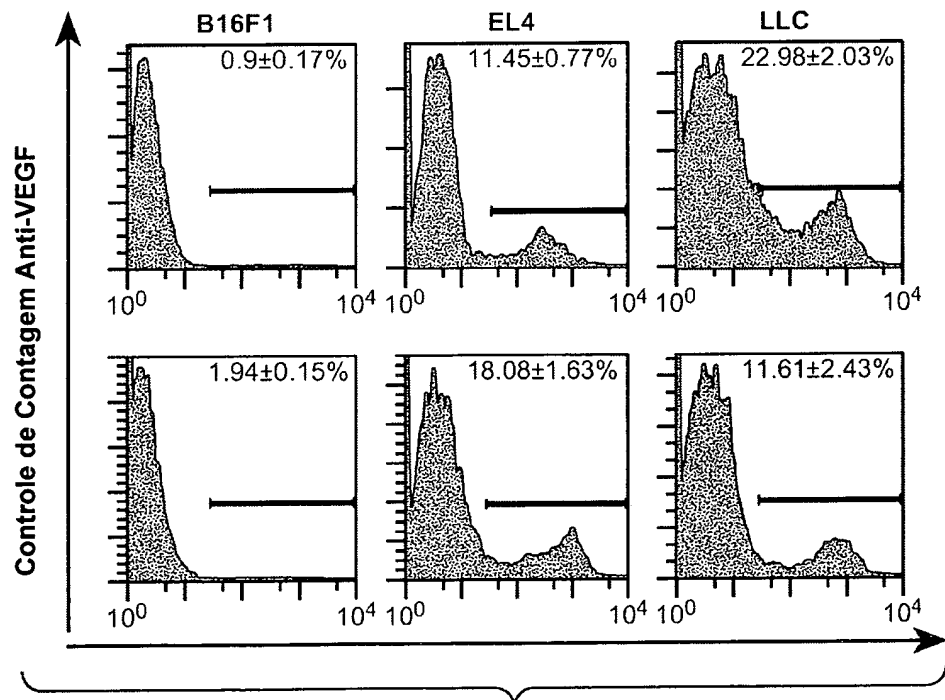
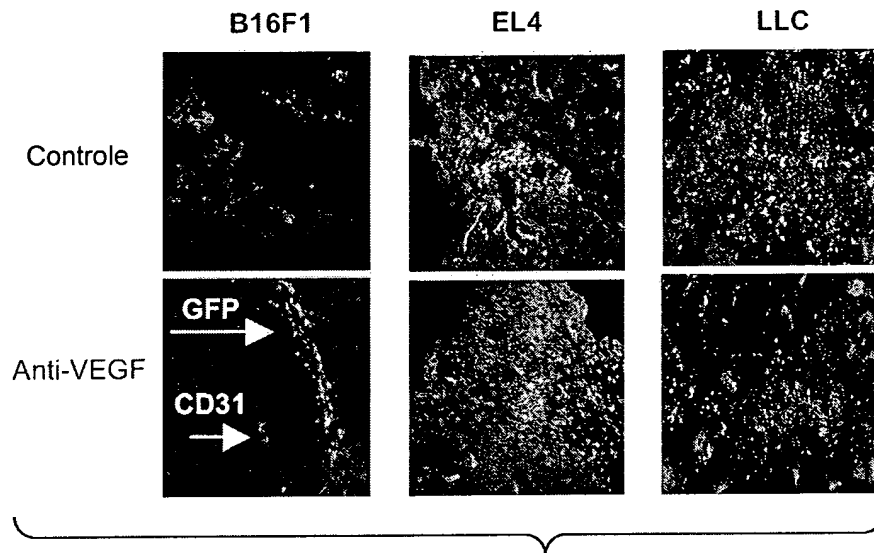
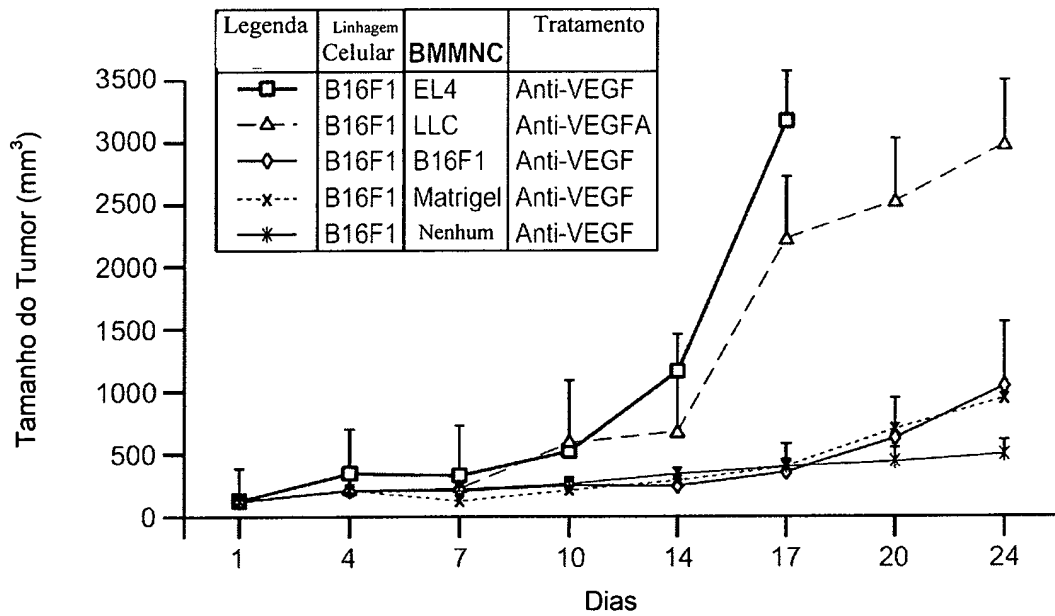
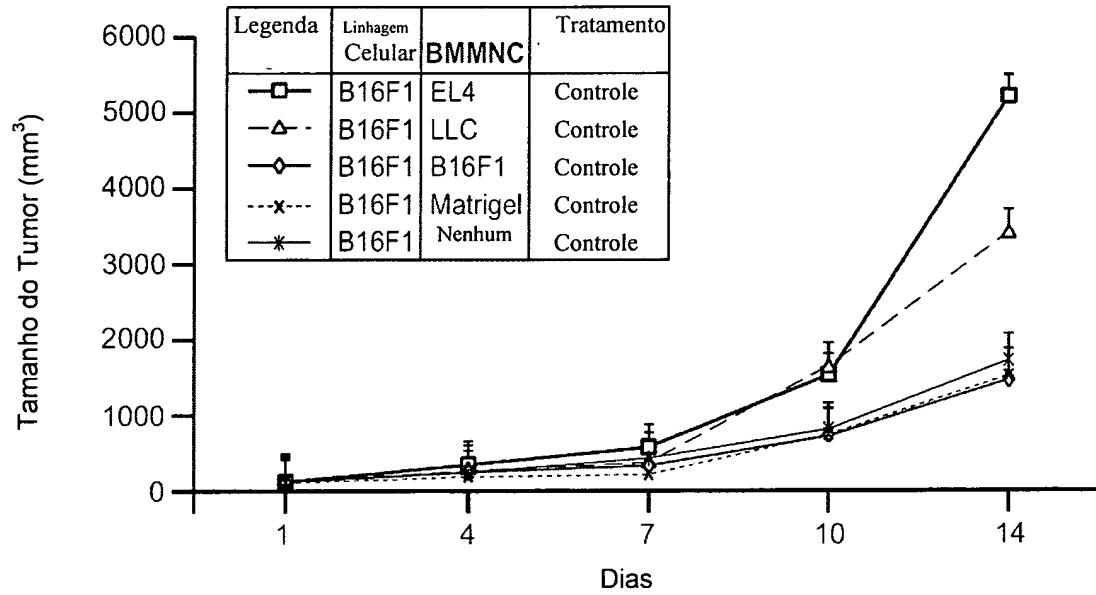


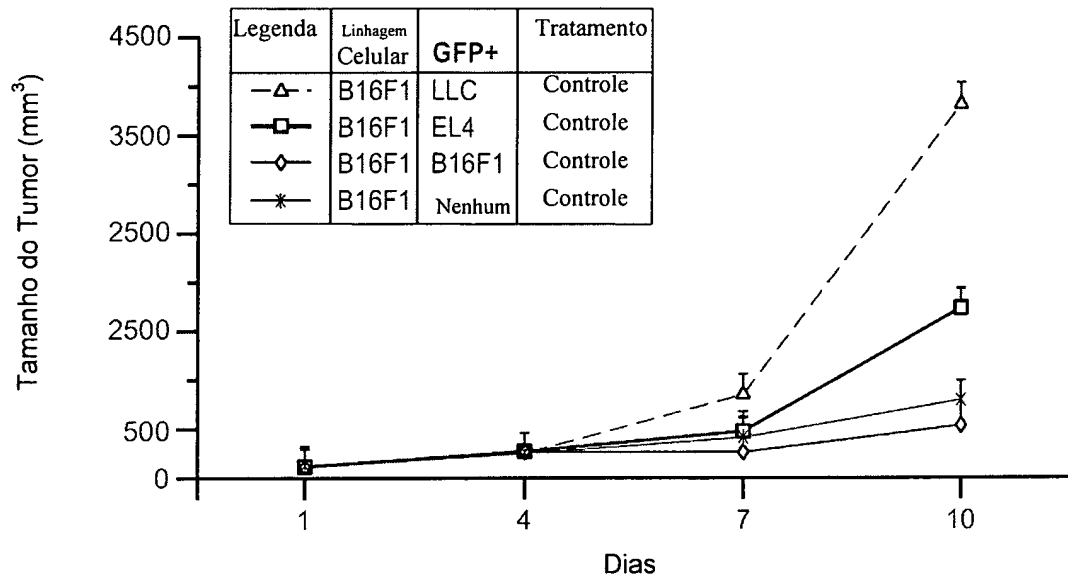
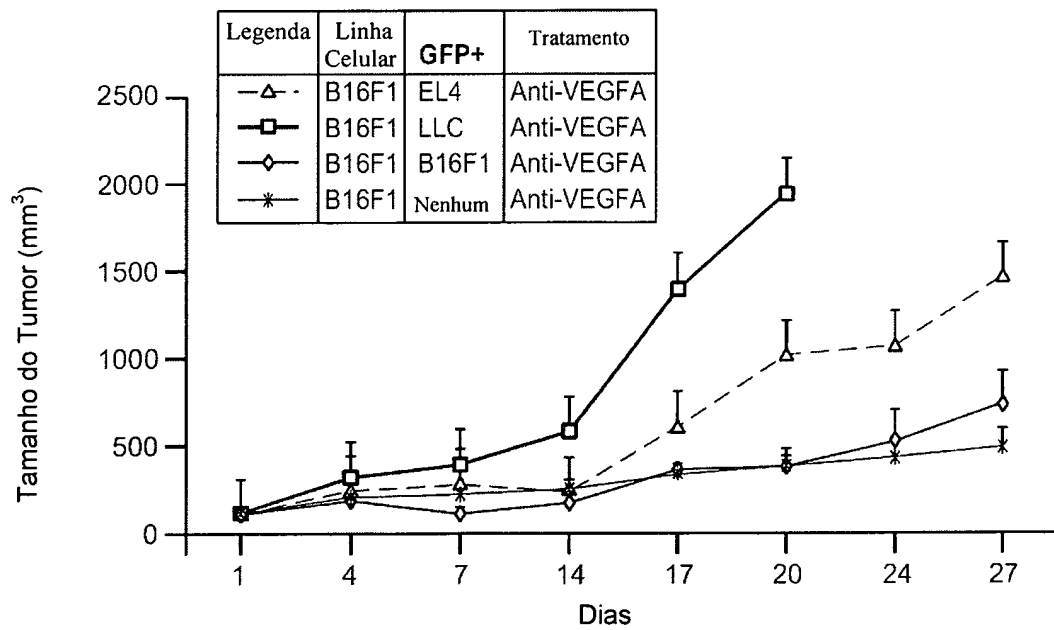
Fig. 1d

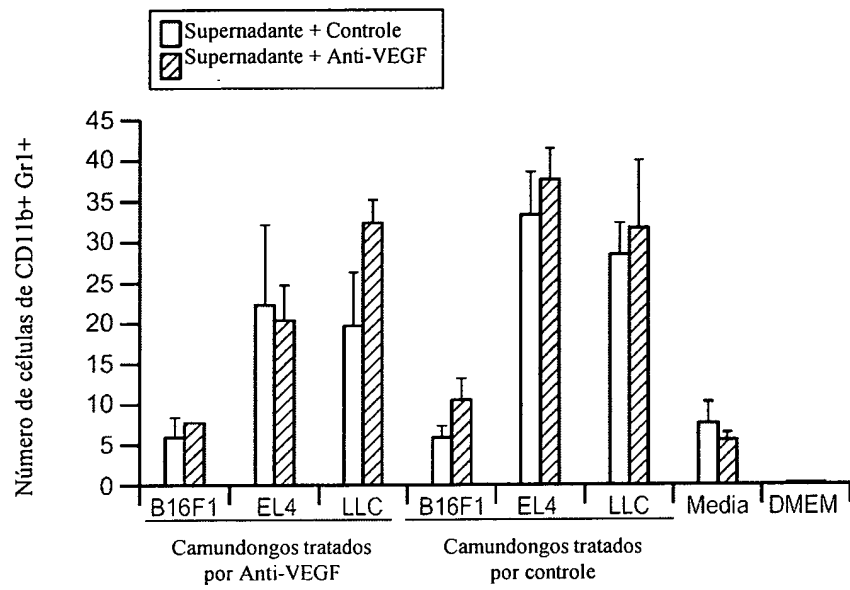
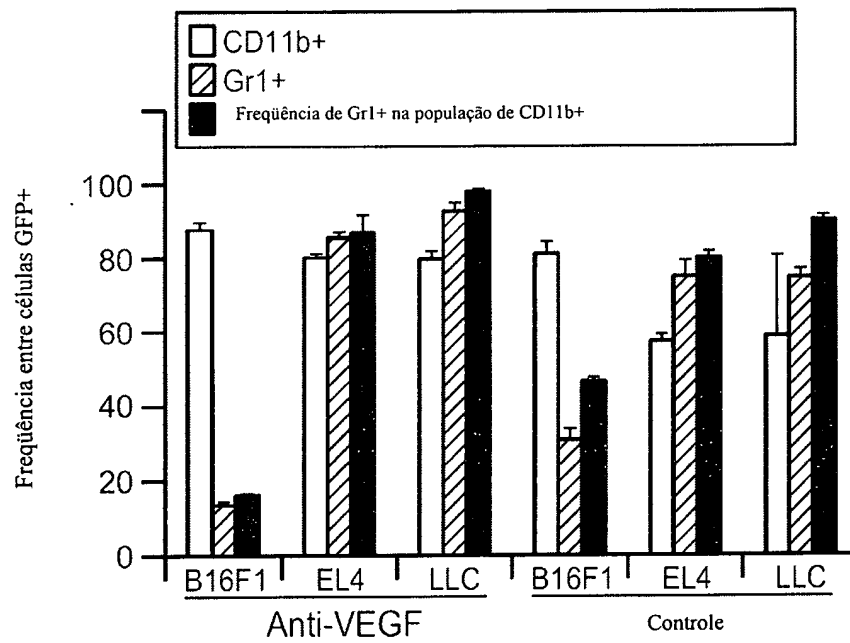
**Fig. 1e**

	Controle	Anti-VEGF
B16F1	$2.40 \pm 1.65\%$	$0.28 \pm 0.25\%$
LLC	$1.63 \pm 0.41\%$	$0.52 \pm 0.43\%$
EL4	$3.54 \pm 0.43\%$	$1.93 \pm 0.31\%$

Fig. 1f



**Fig. 2c****Fig. 2d**

**Fig. 3a****Fig. 3b**

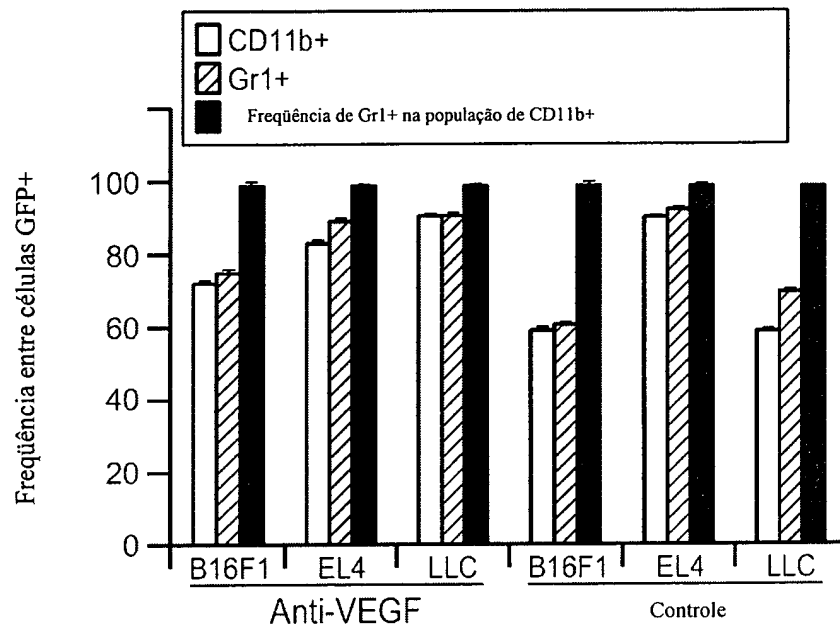


Fig. 3c

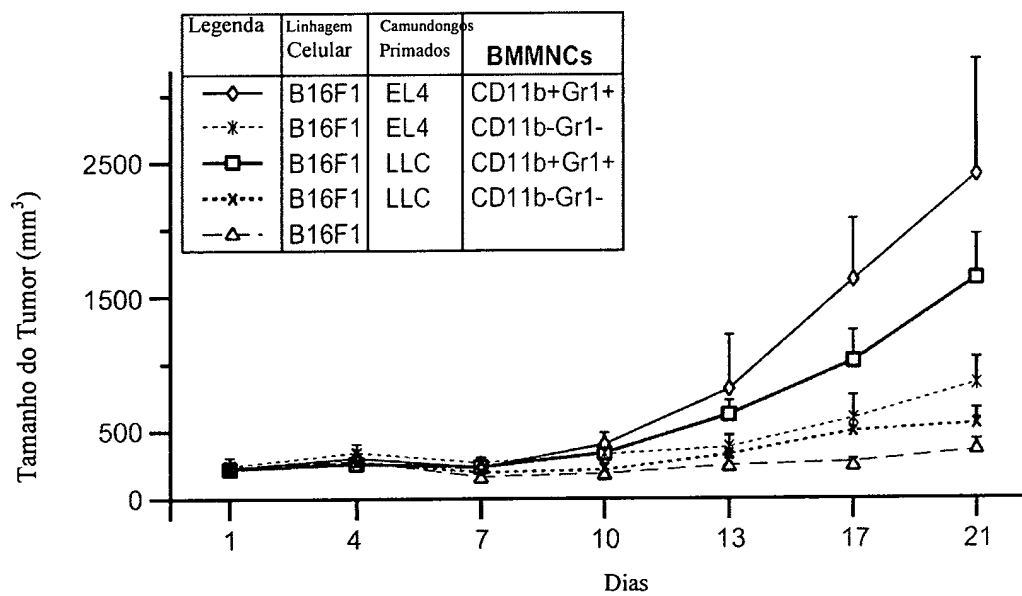
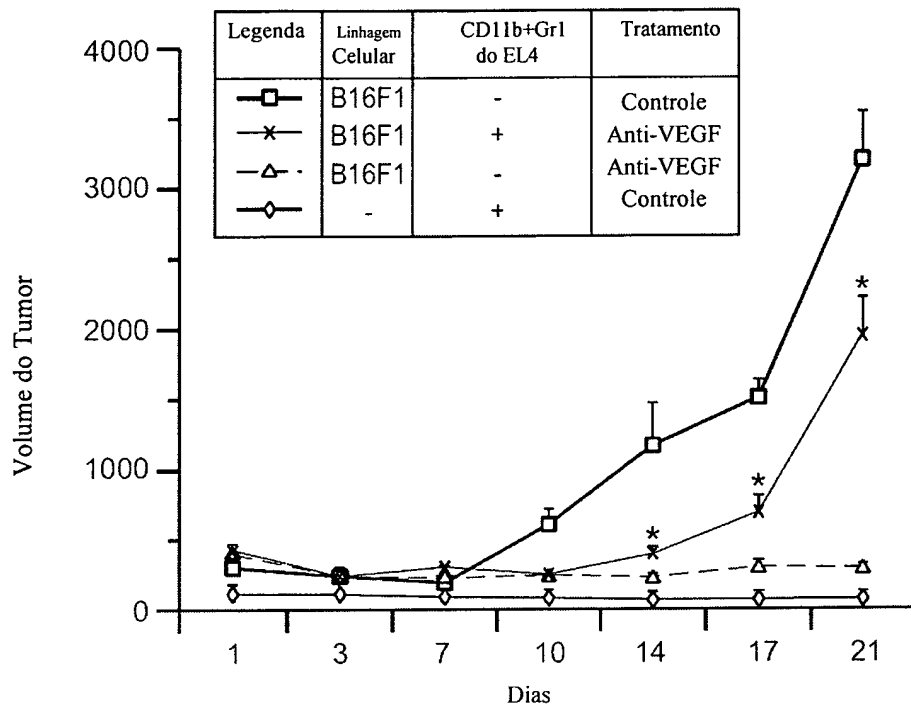
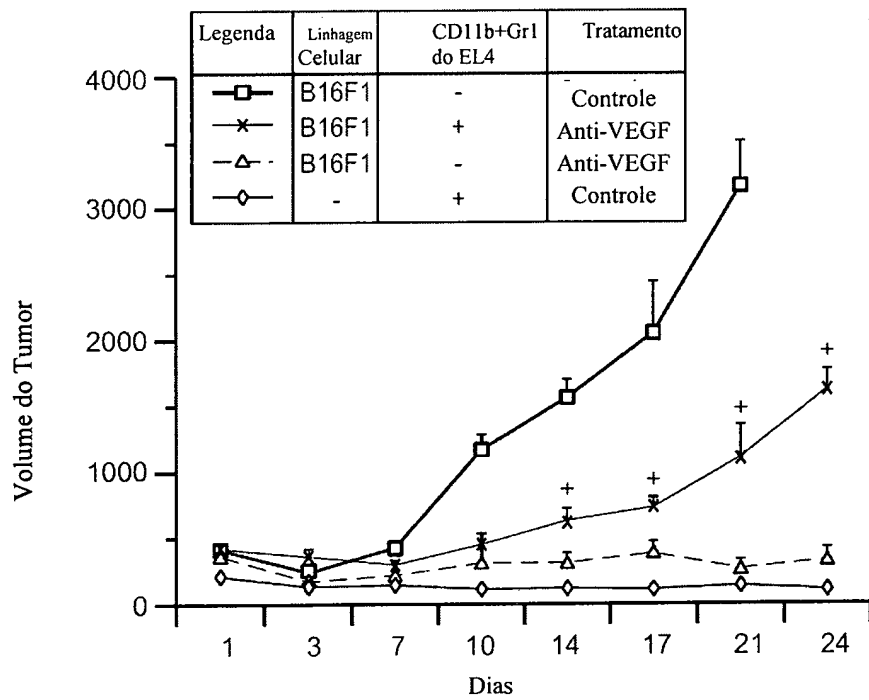
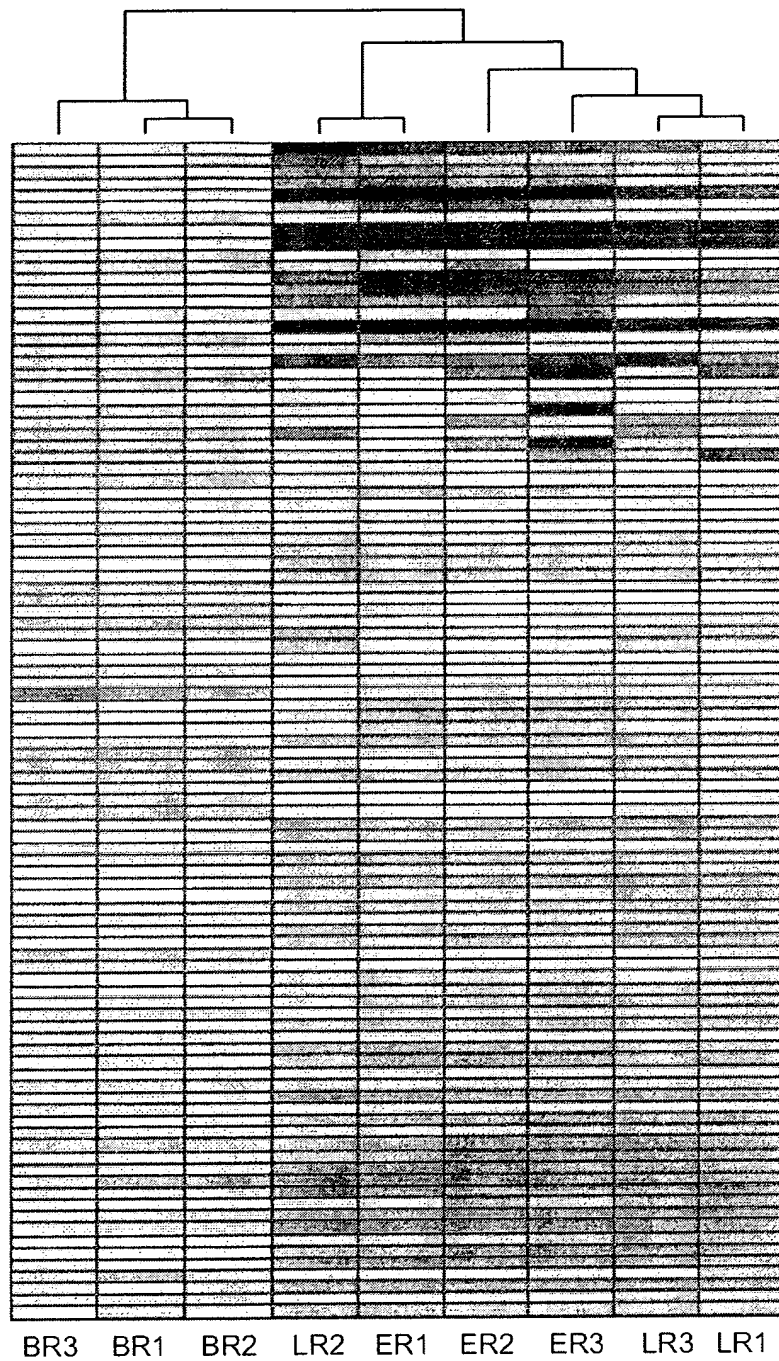
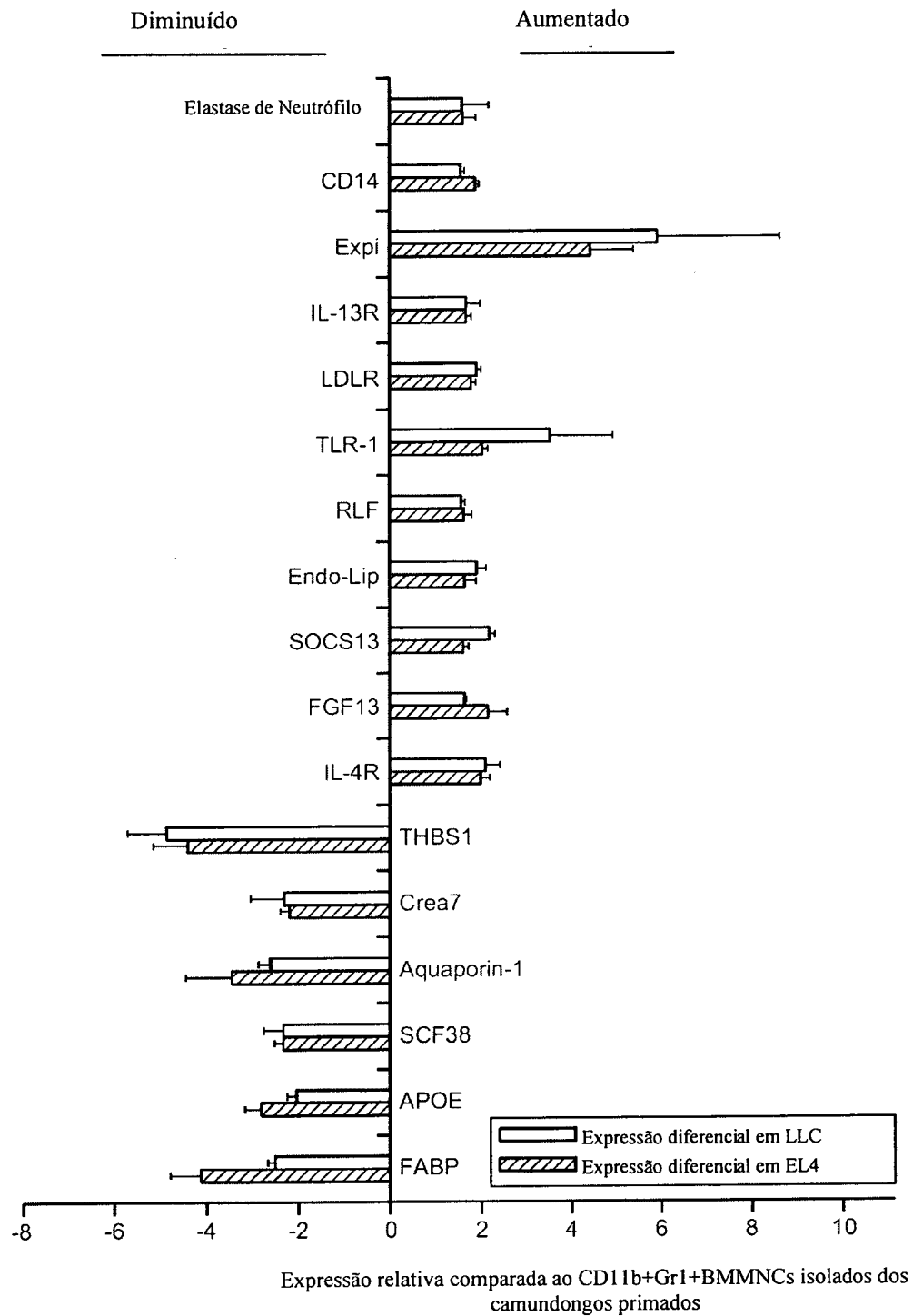
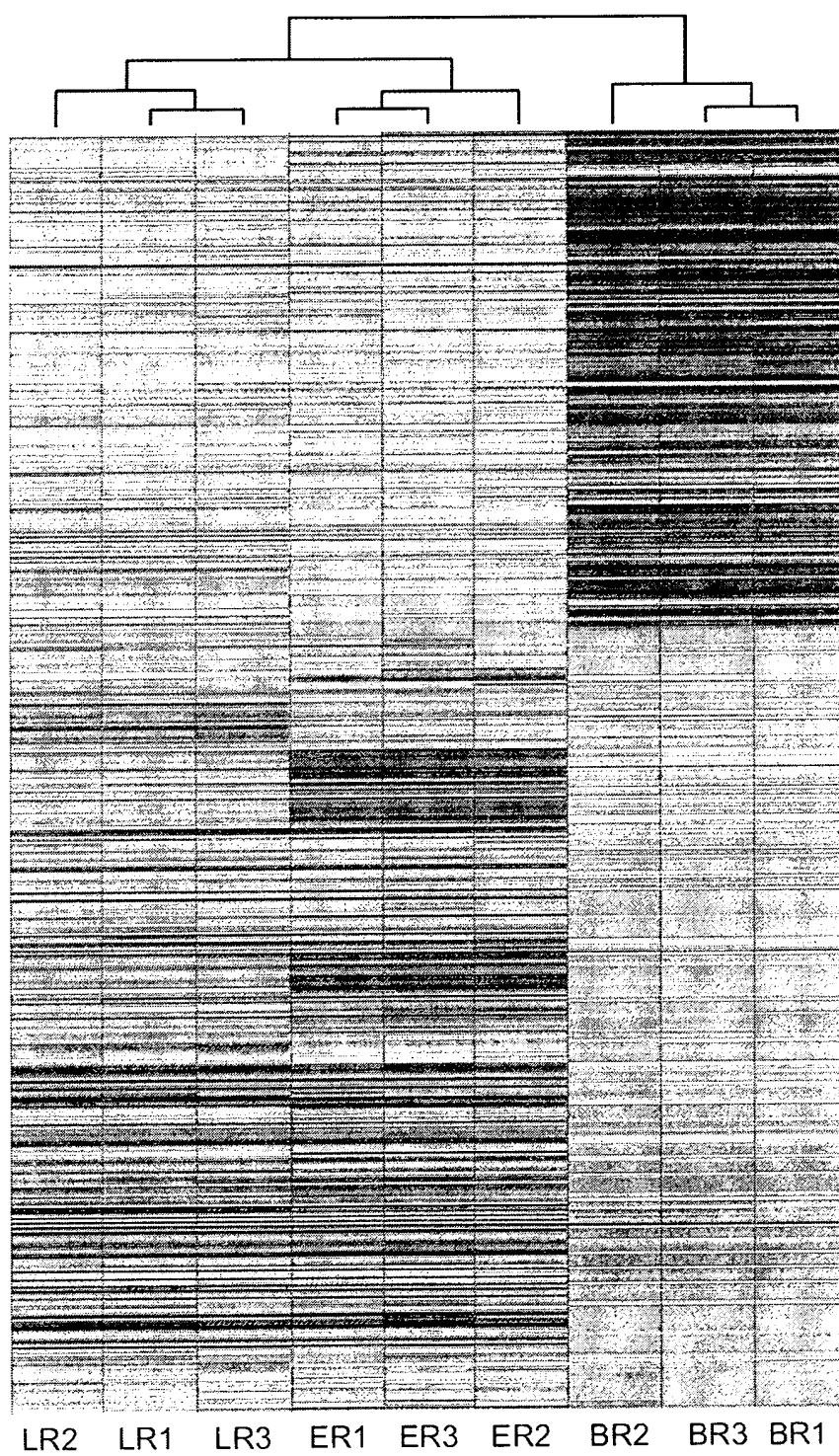


Fig. 3d

**Fig. 3e****Fig. 3f**

**Fig. 4a**

**Fig. 4b**

**Fig. 4c**

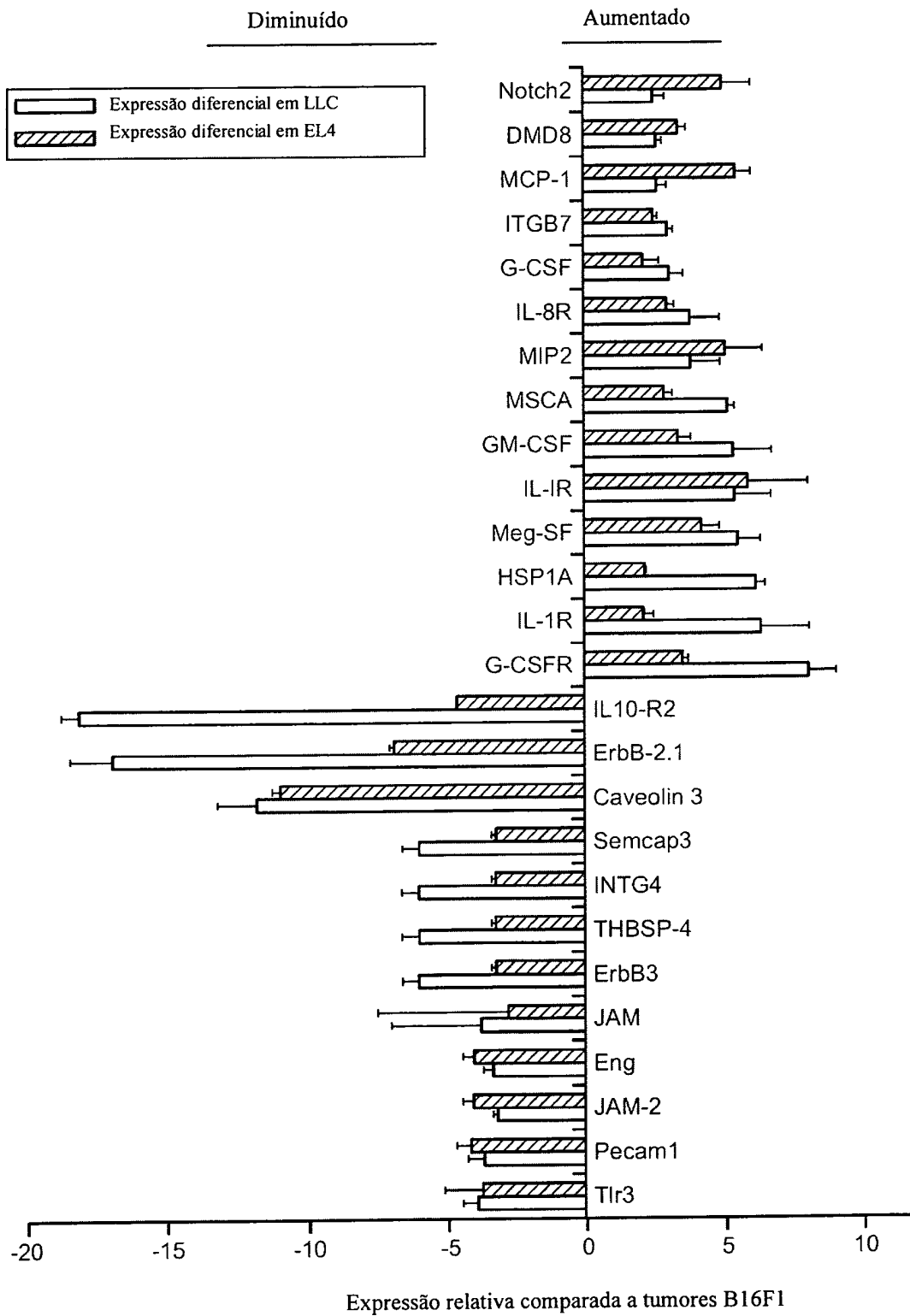
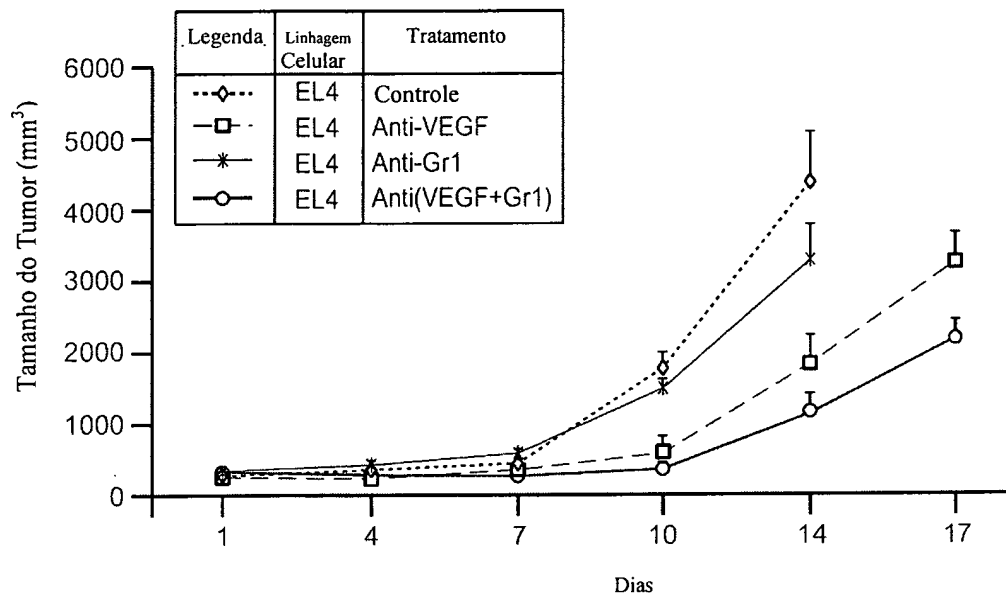
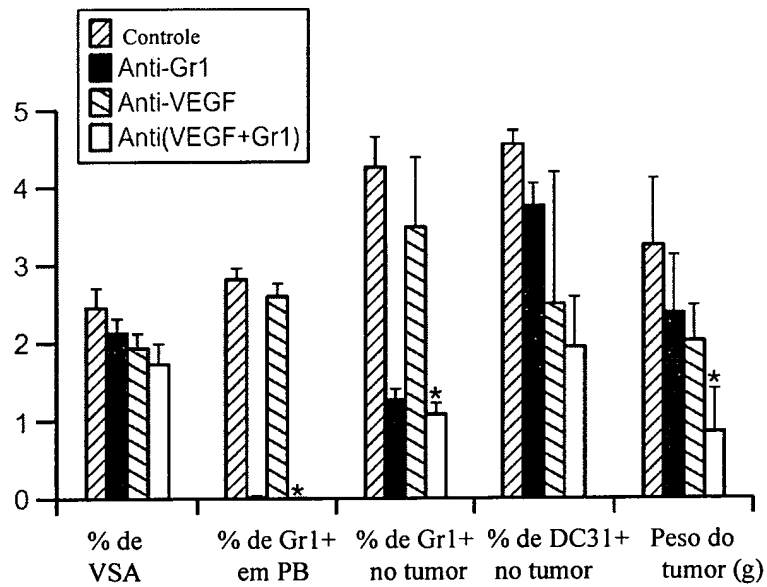
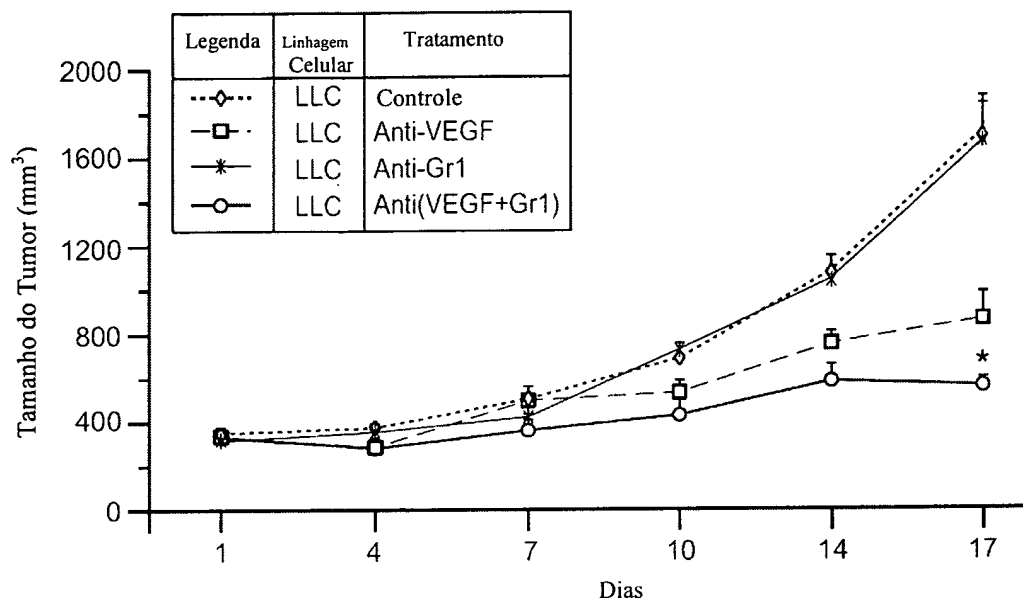
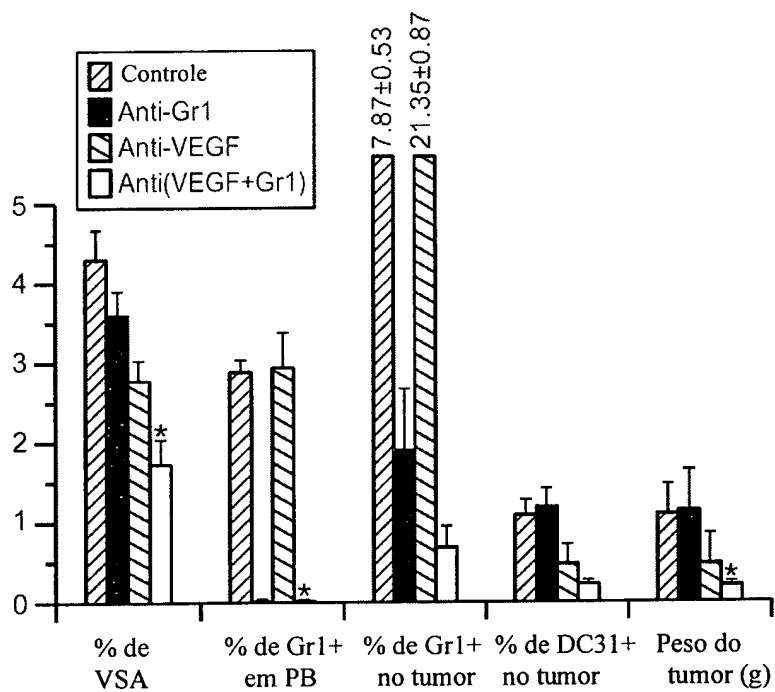
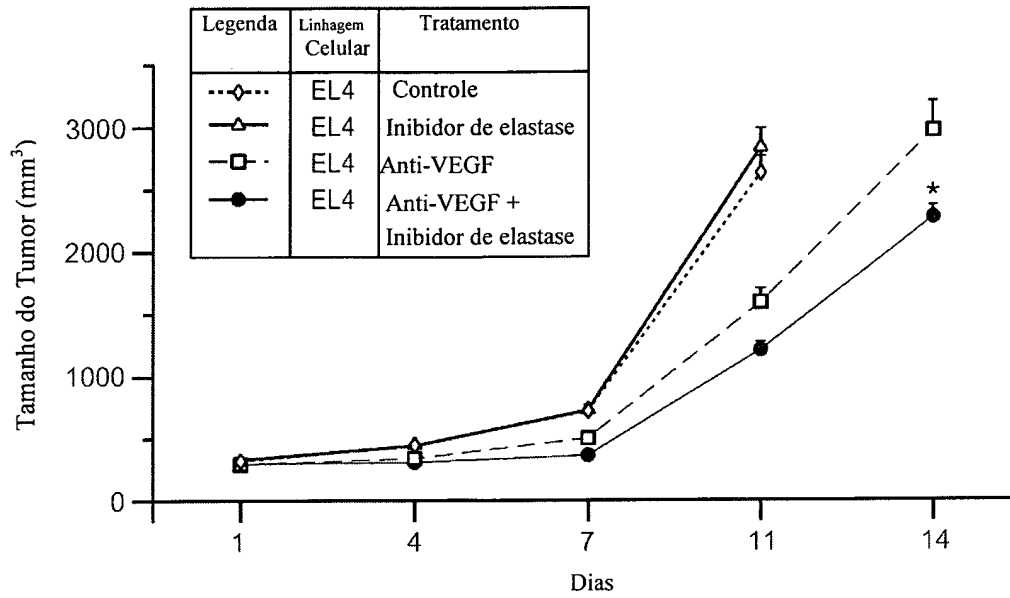
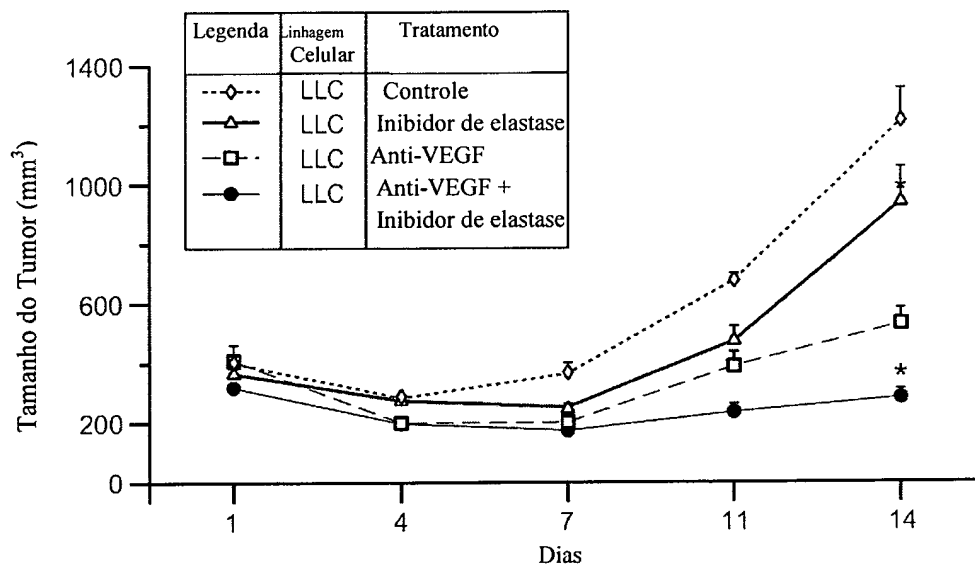
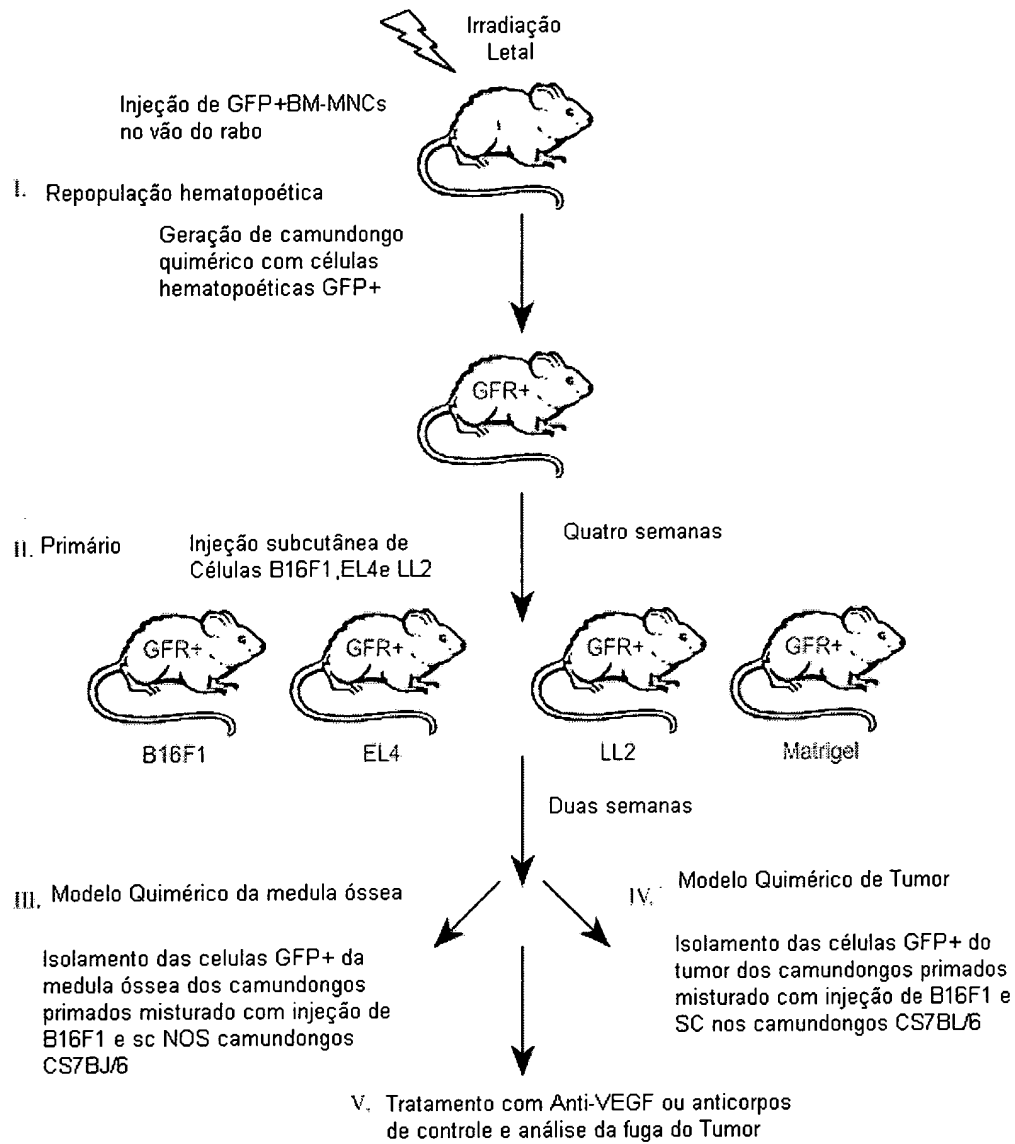


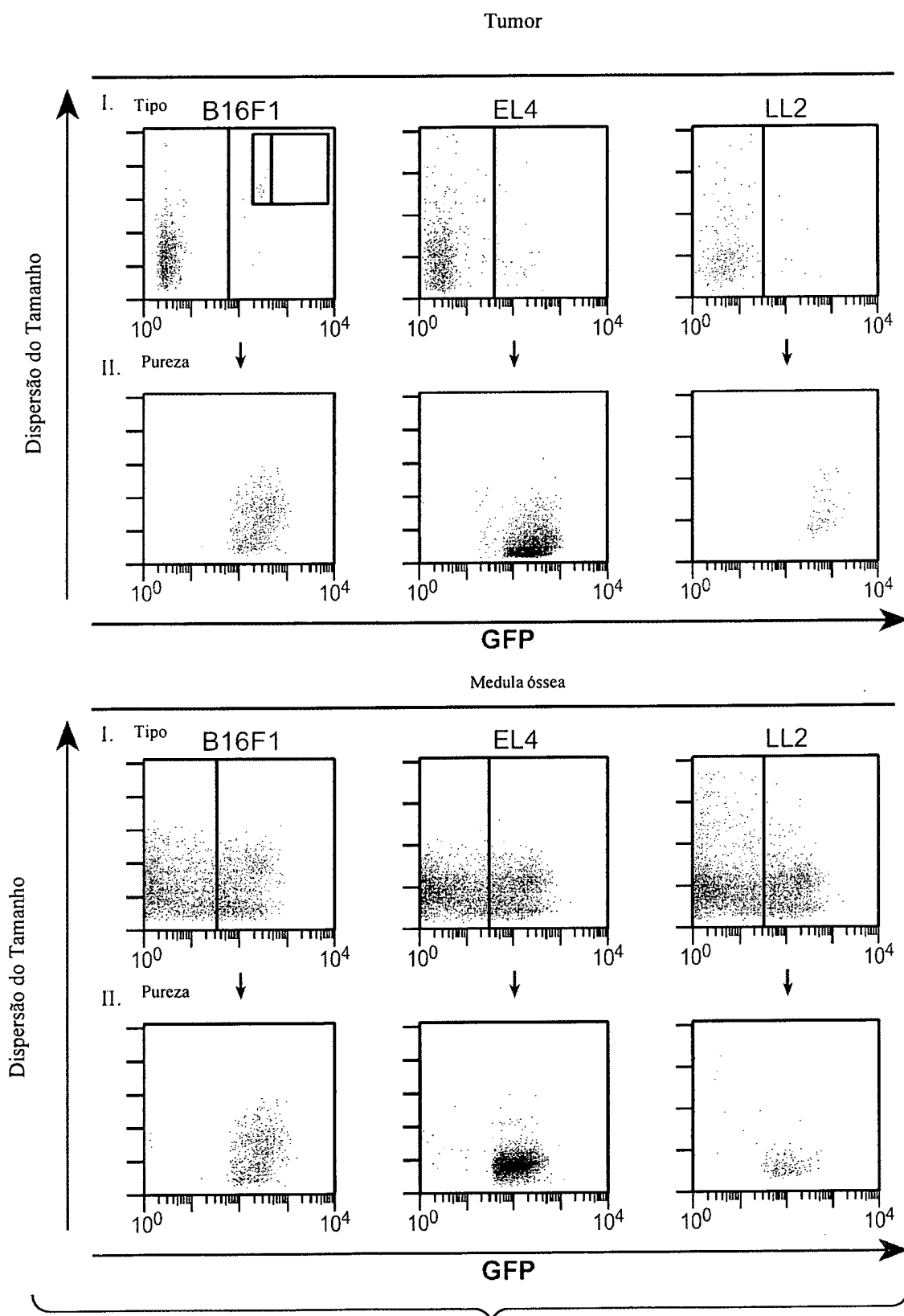
Fig. 4d

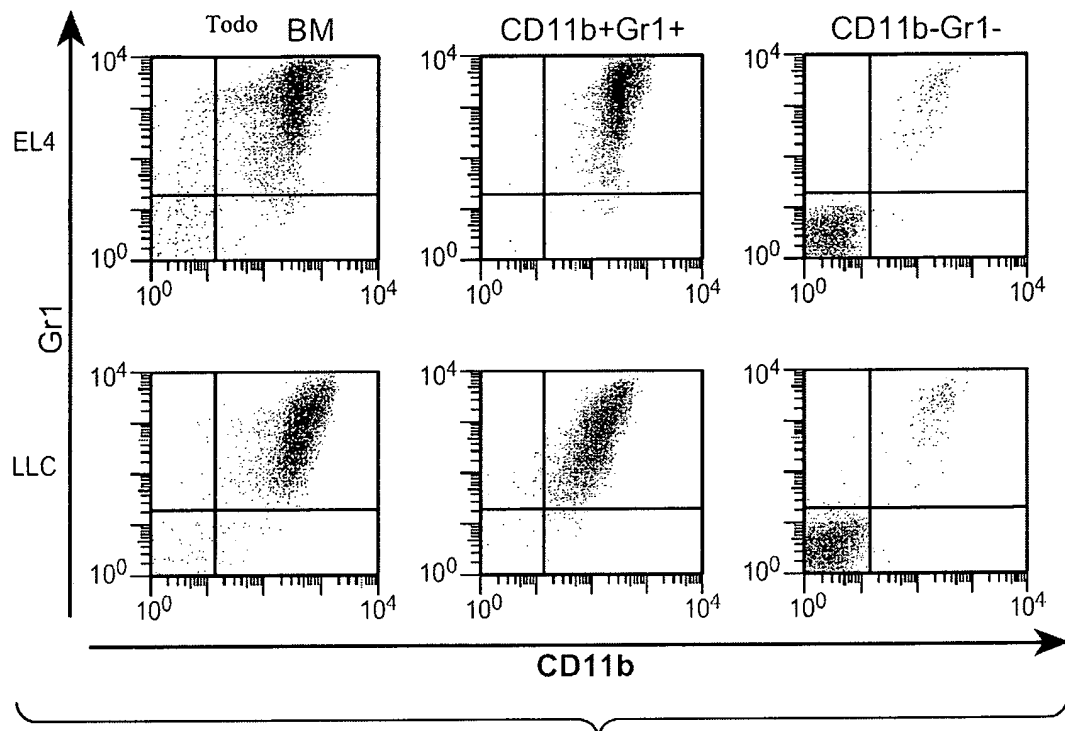
**Fig. 5a****Fig. 5b**

**Fig. 5c****Fig. 5d**

**Fig. 5e****Fig. 5f**

**Fig. 6a**

**Fig. 6b**

**Fig. 7**

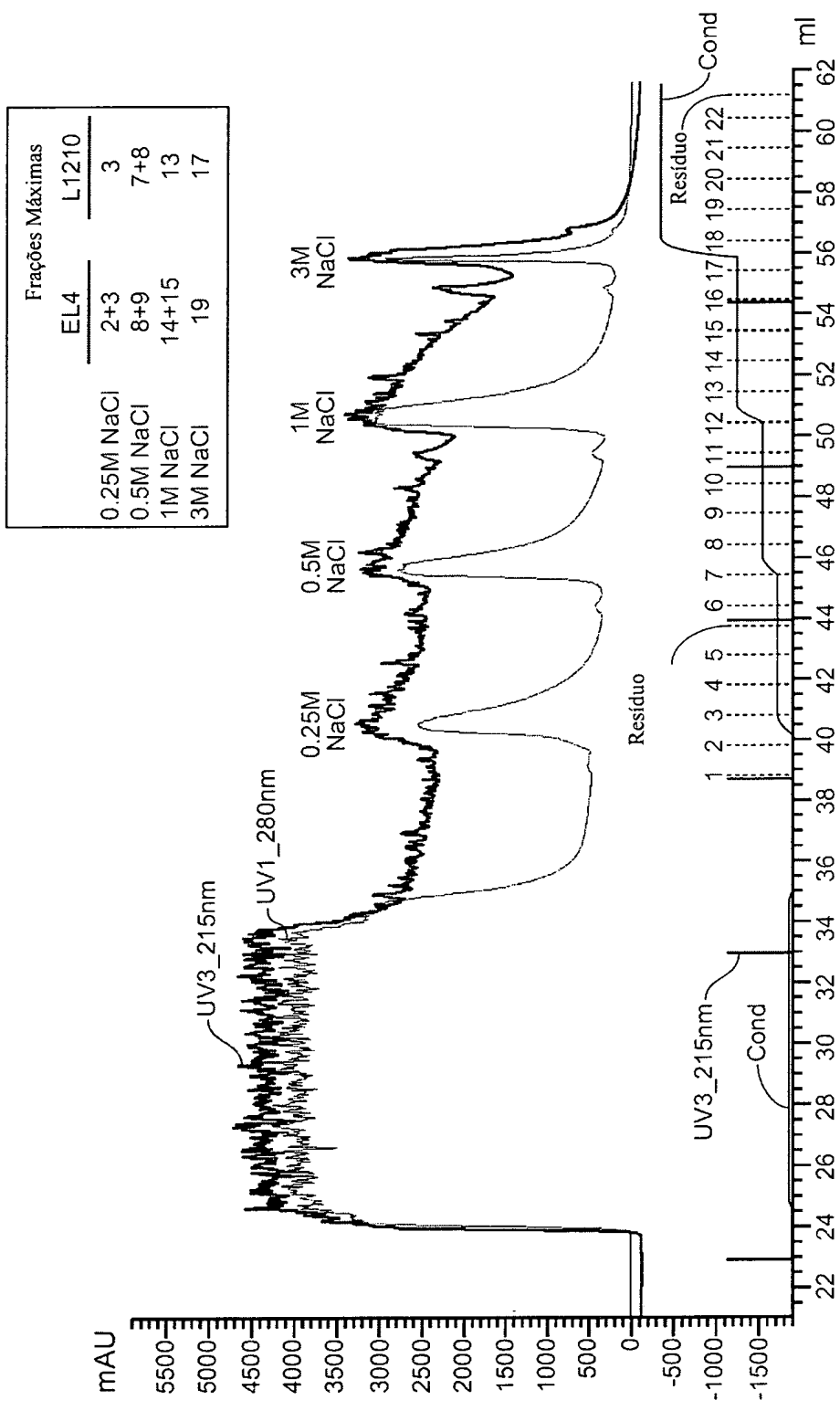
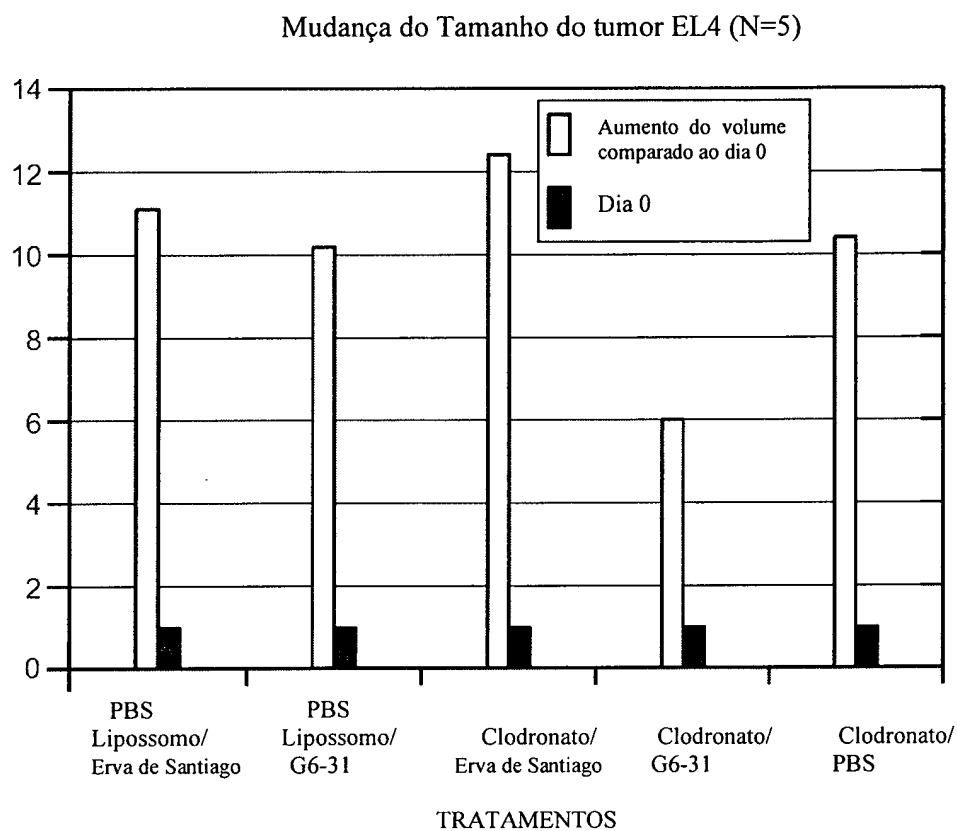
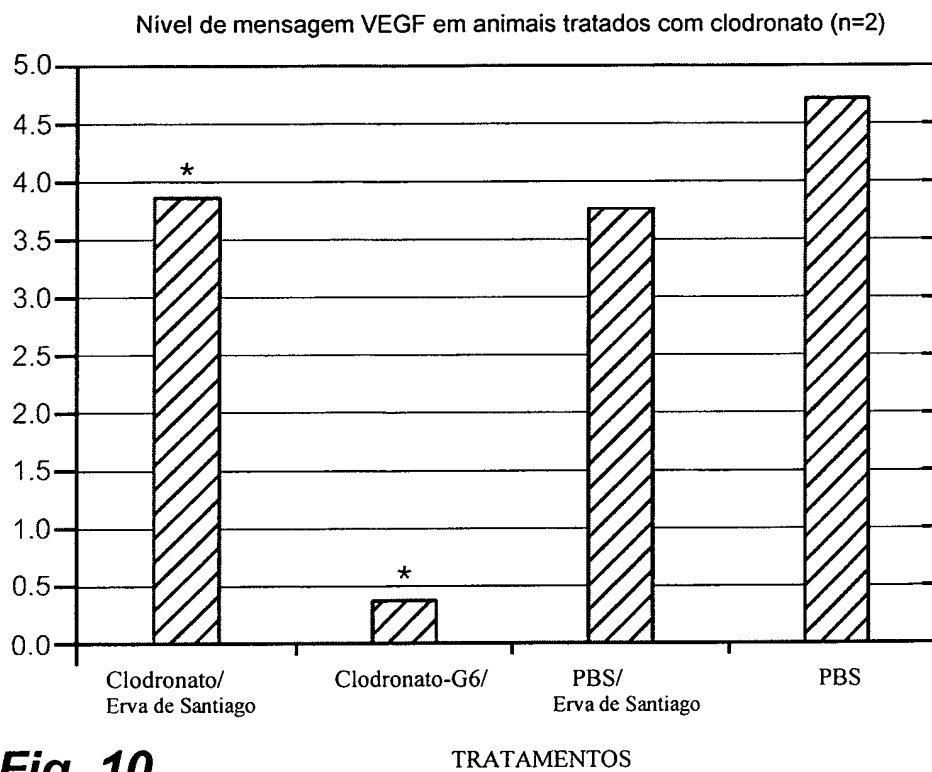
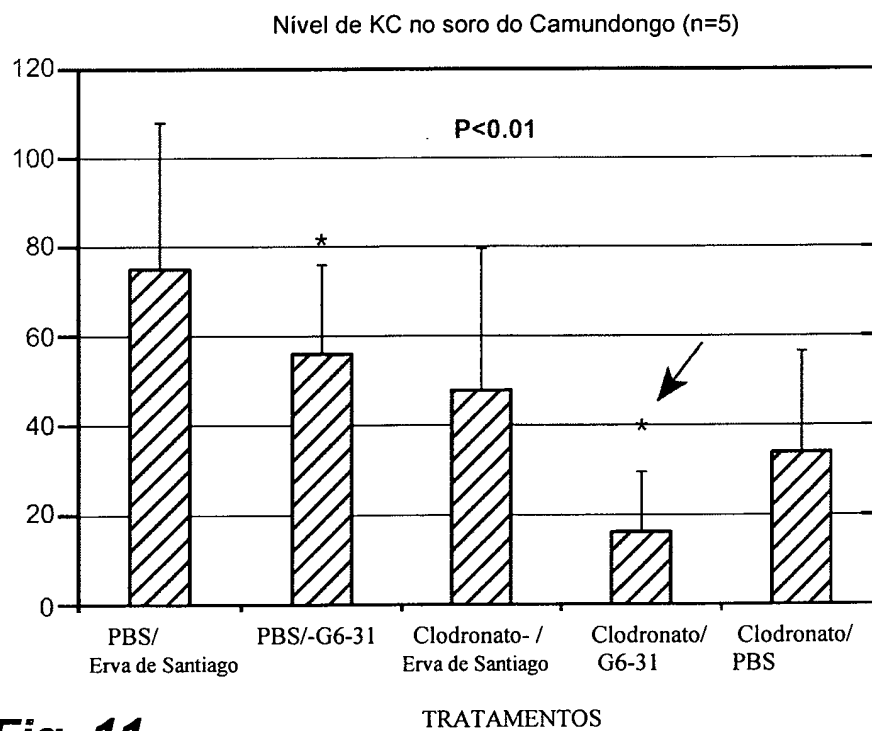


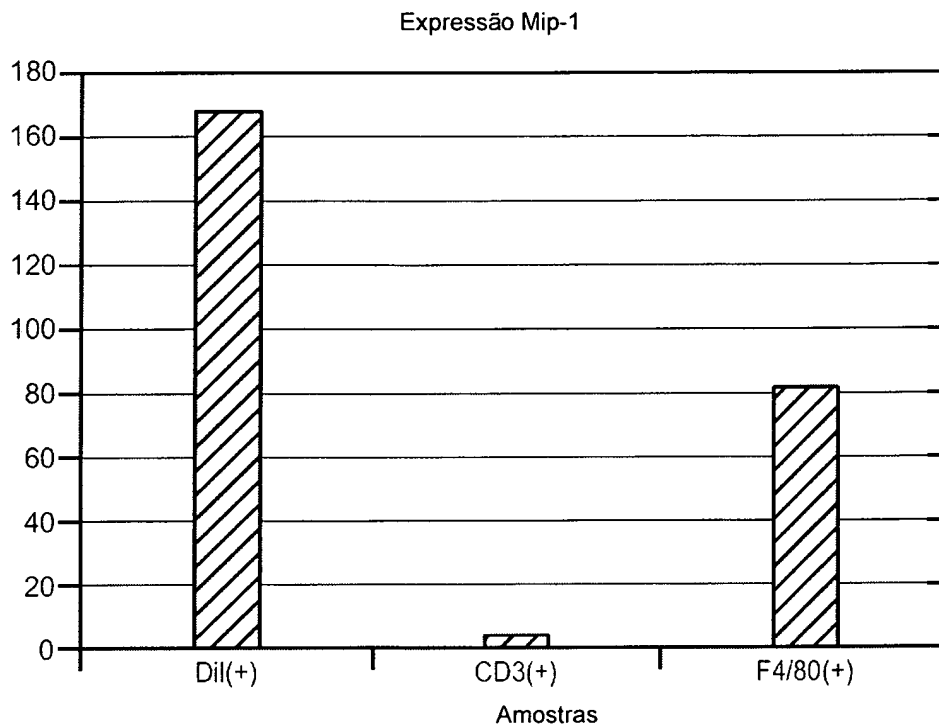
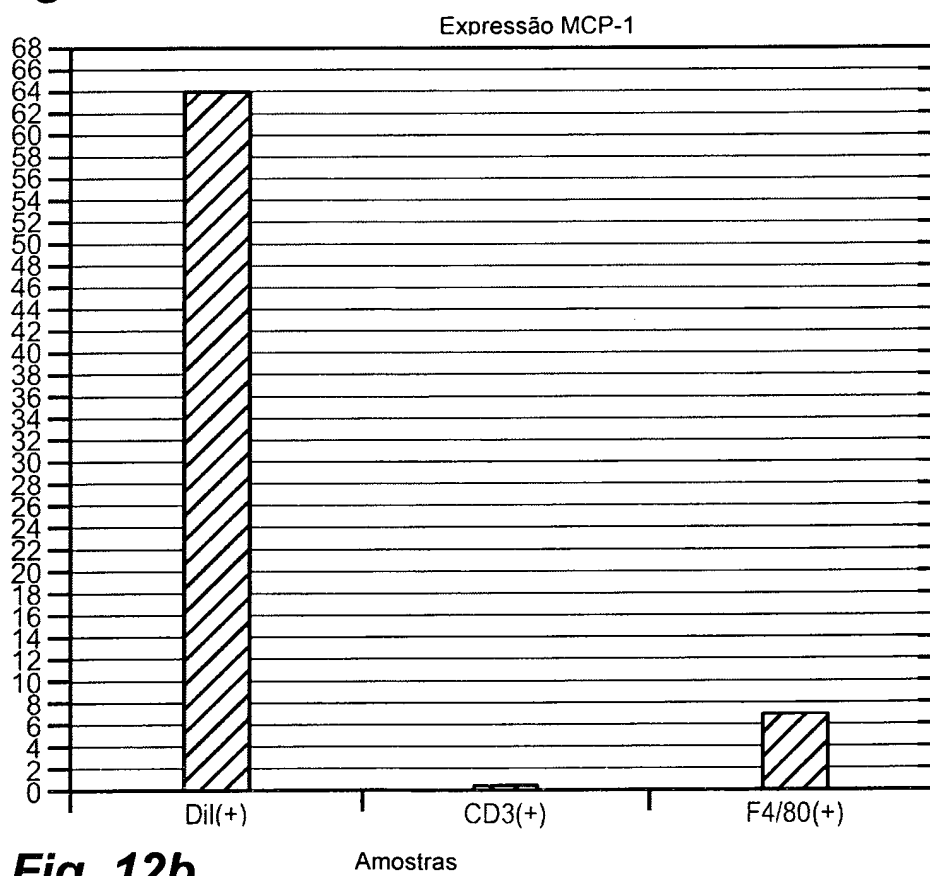
Fig. 8



	72 horas depois da última dose		
	Pbs-Lipossomo/ Erva de Santiago	Clodronato-Lipossomo/ Erva de Santiago	Clodronato Lipossomo/ G631
Média da % de macrófagos no sangue	5.42	2.62	3.93

Fig. 9

**Fig. 10****Fig. 11**

**Fig. 12a****Fig. 12b**

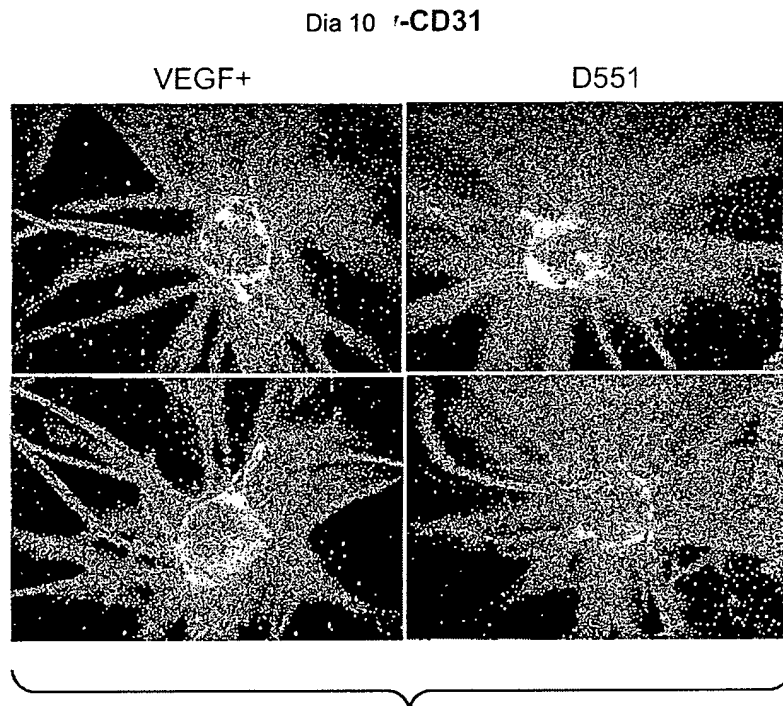


Fig. 13a

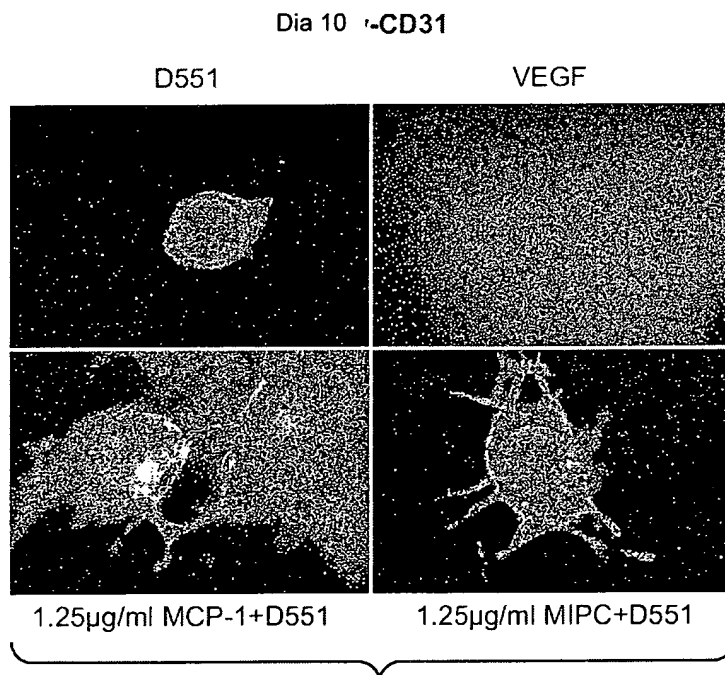


Fig. 13b

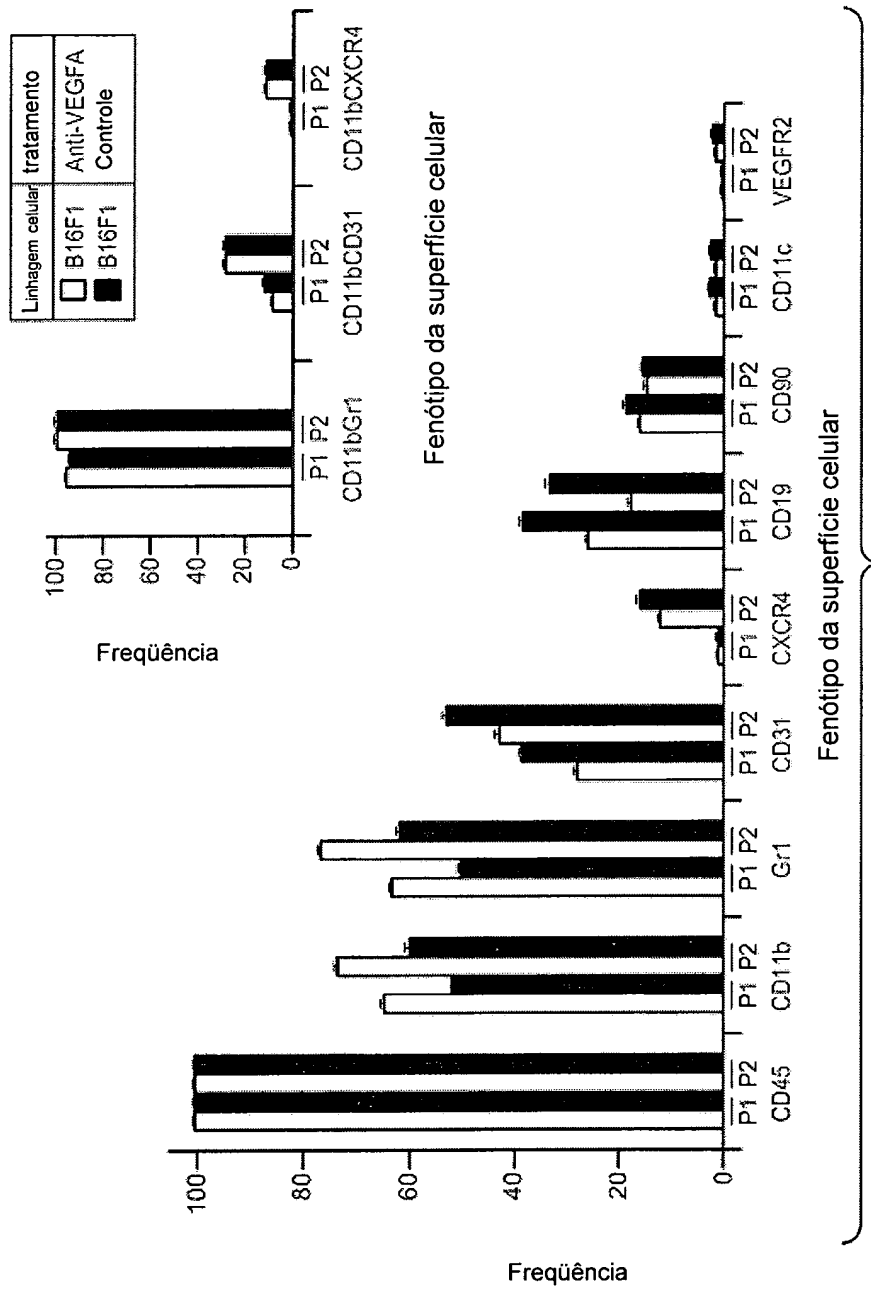


Fig. 14a

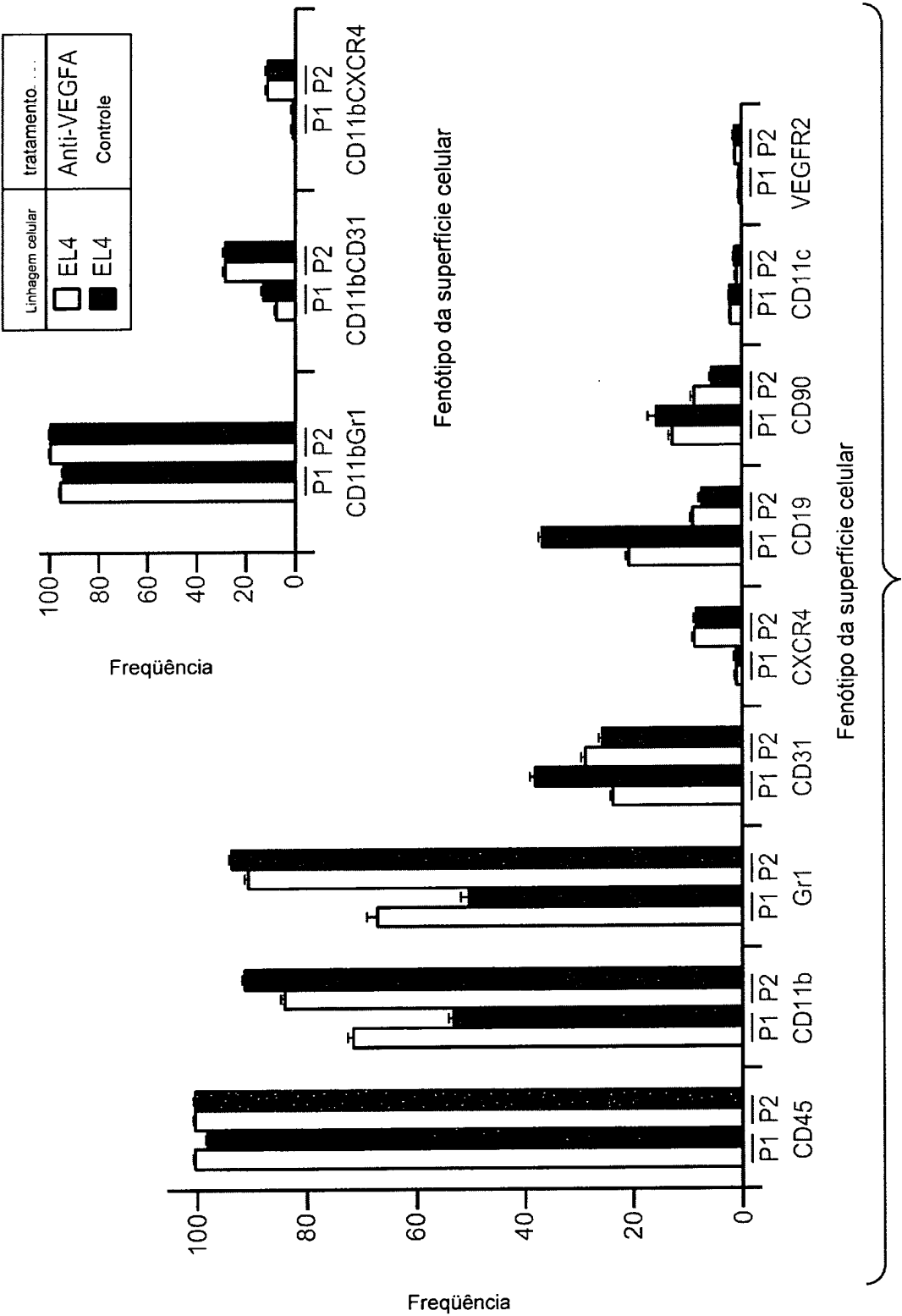


Fig. 14b

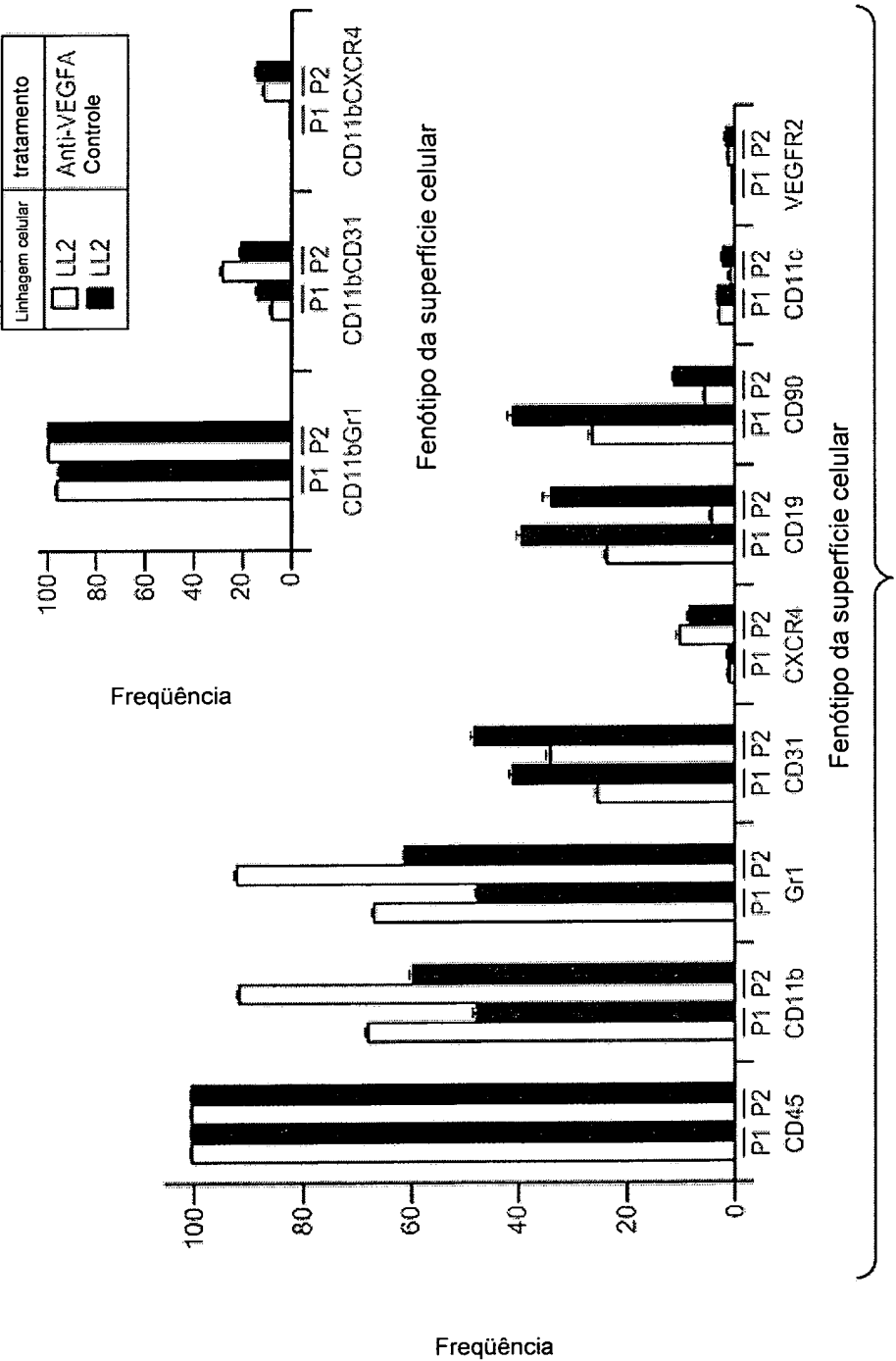


Fig. 14c

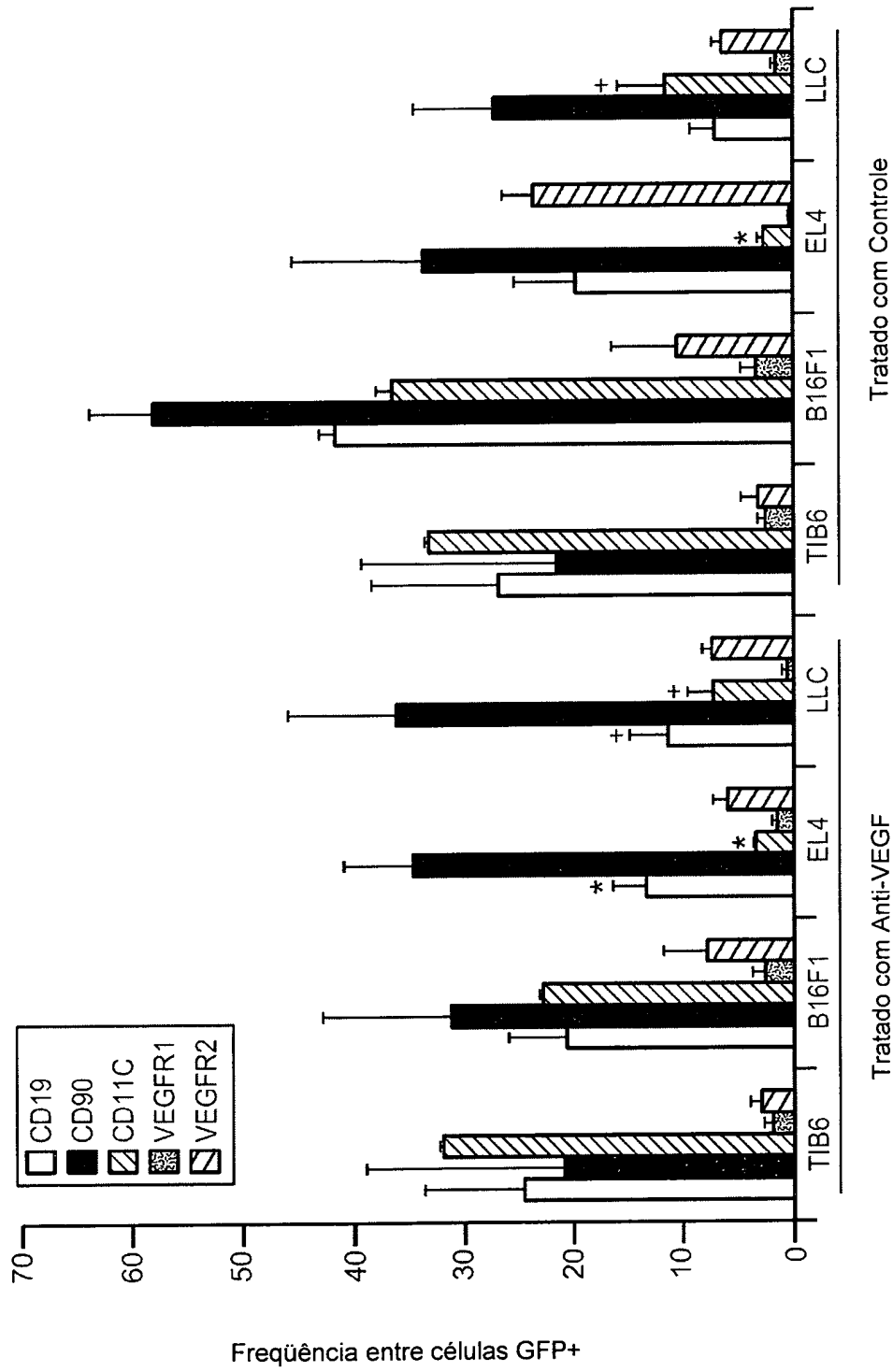


Fig. 14c

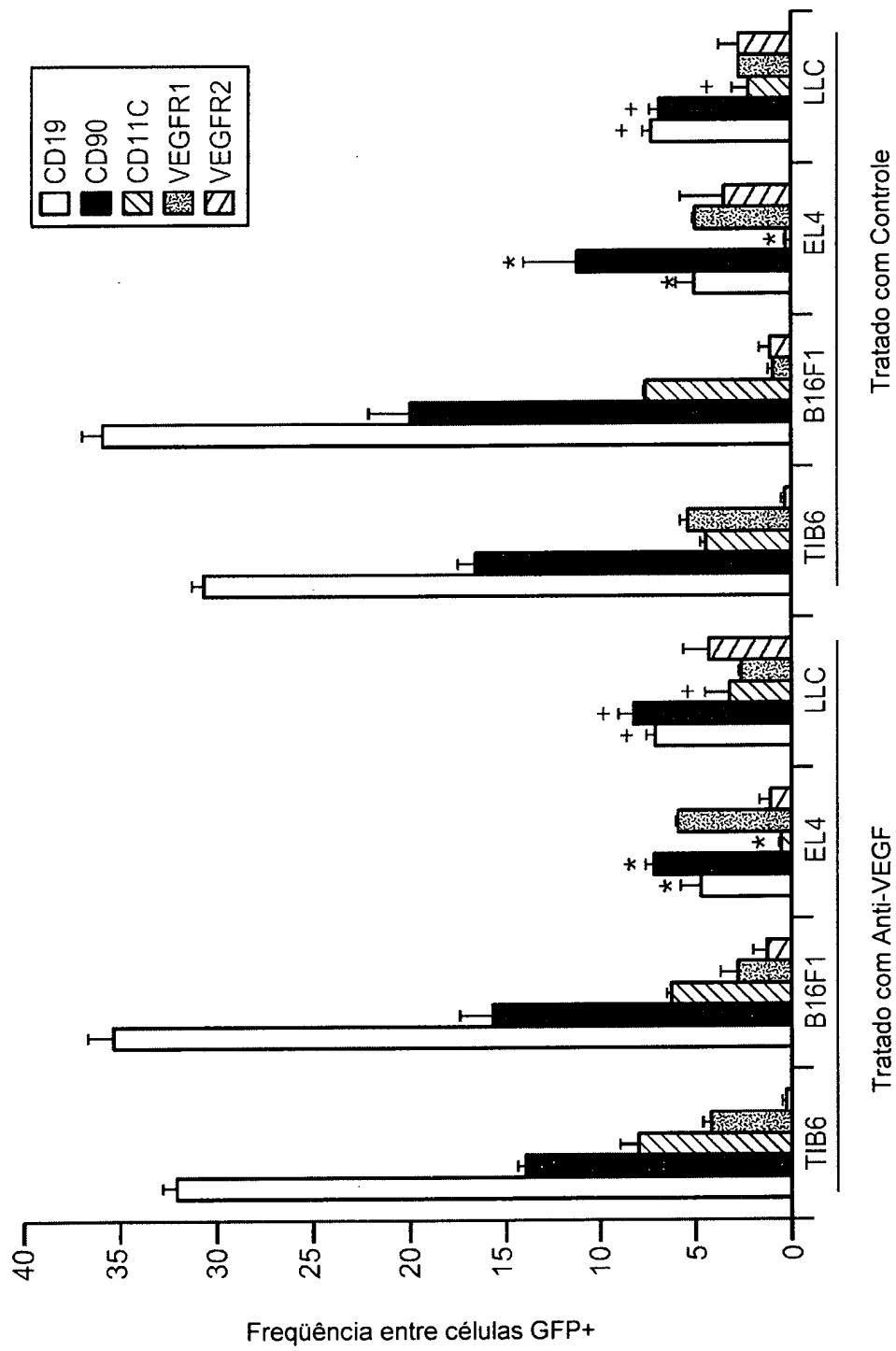
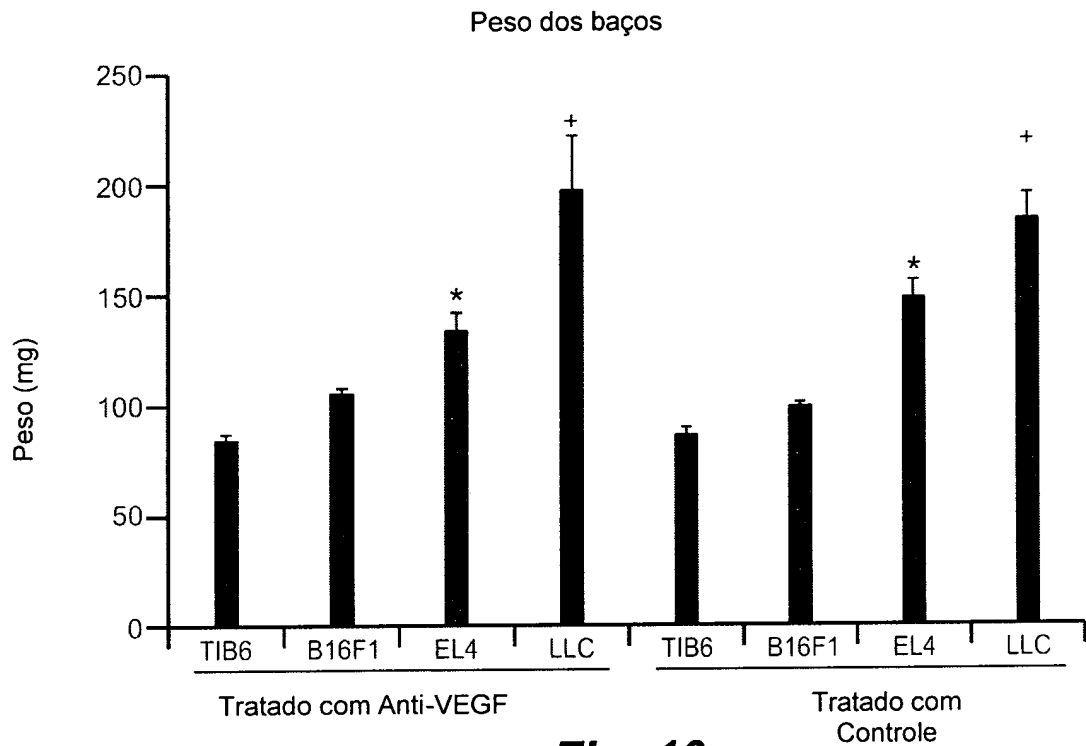
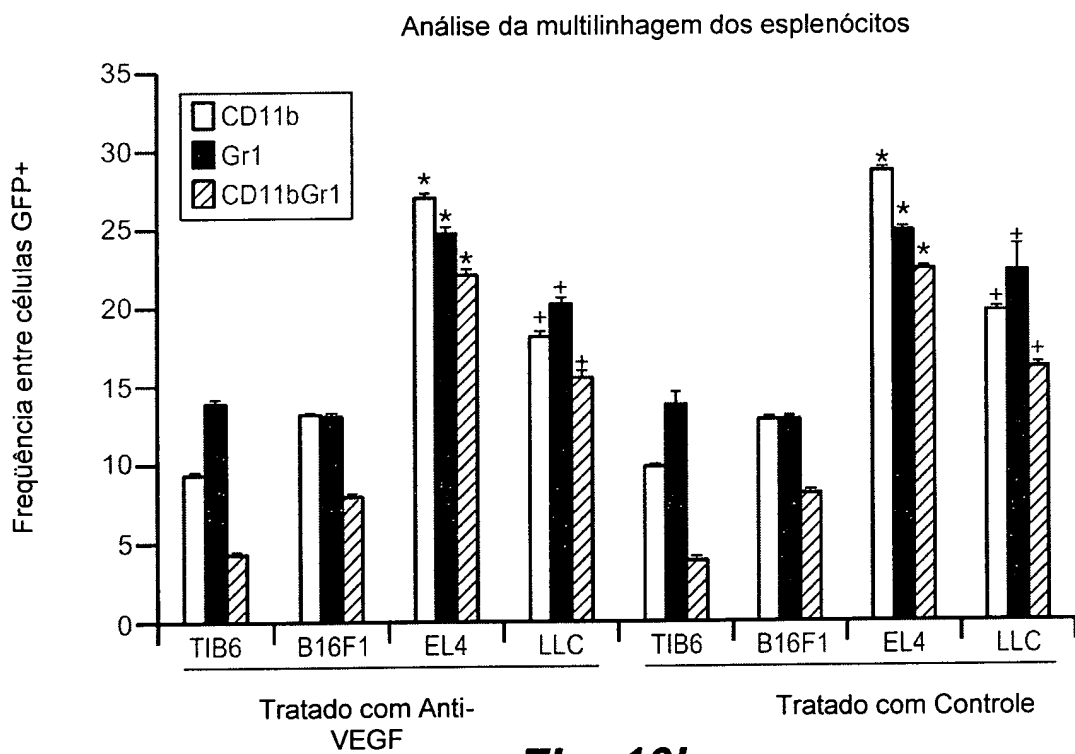


Fig. 15b

**Fig. 16a****Fig. 16b**

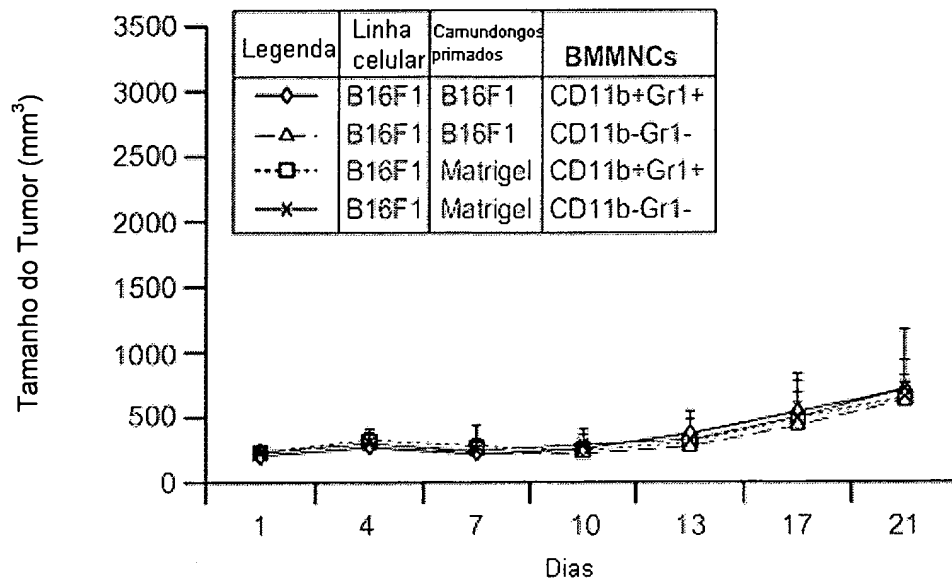


Fig. 17a

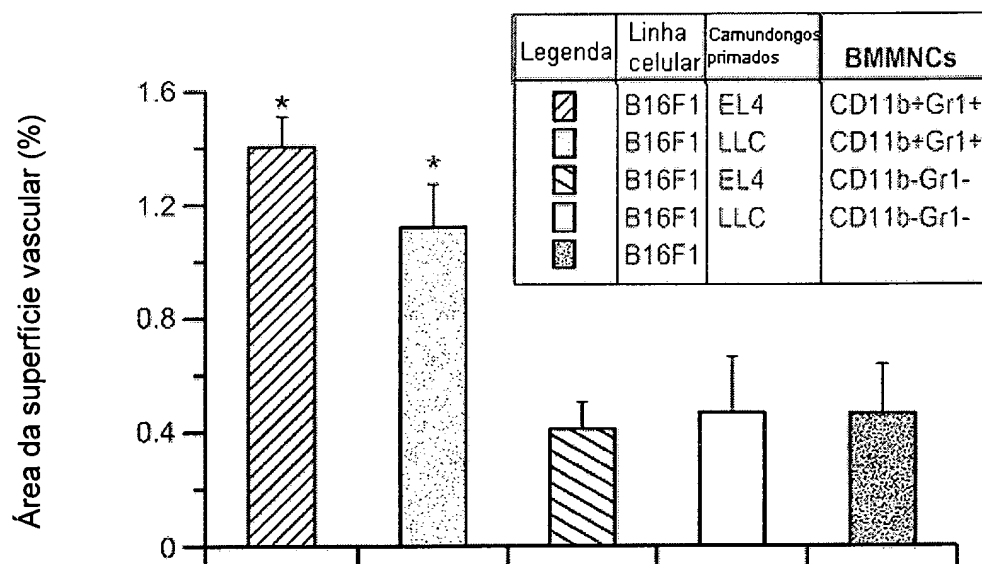
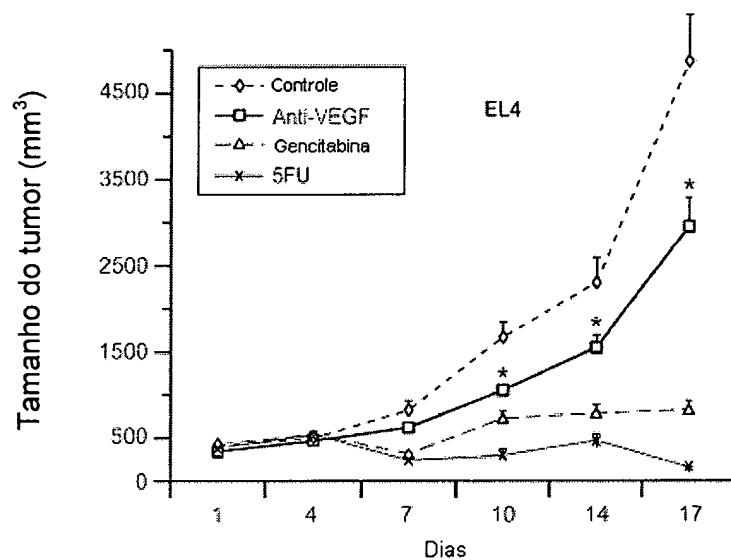
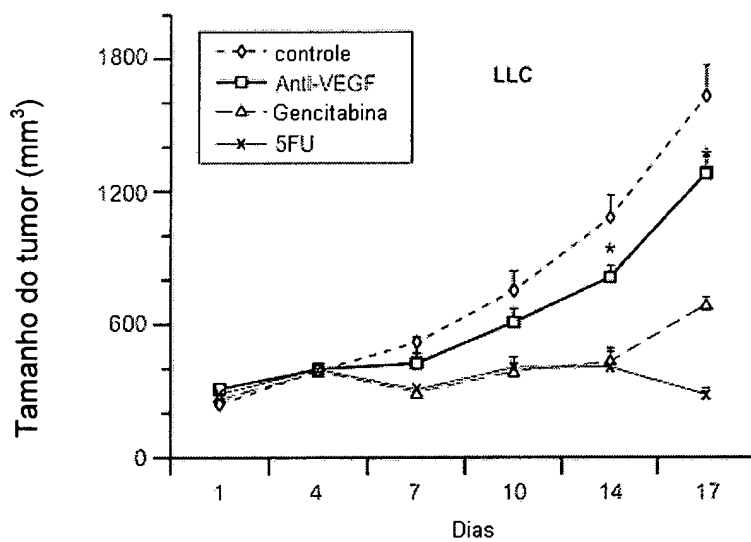
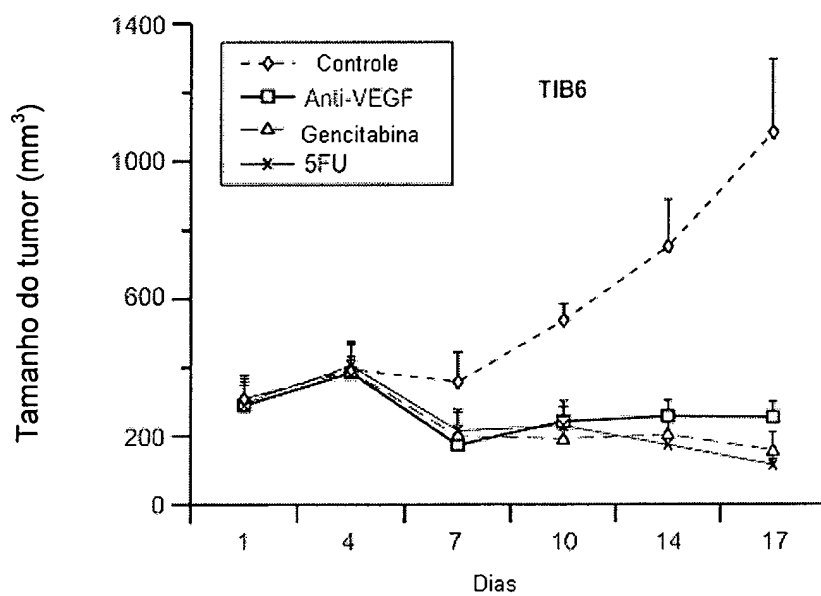
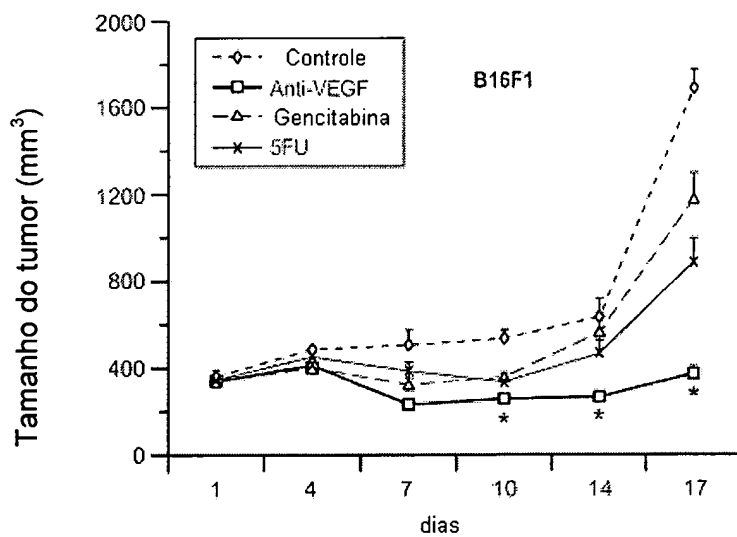
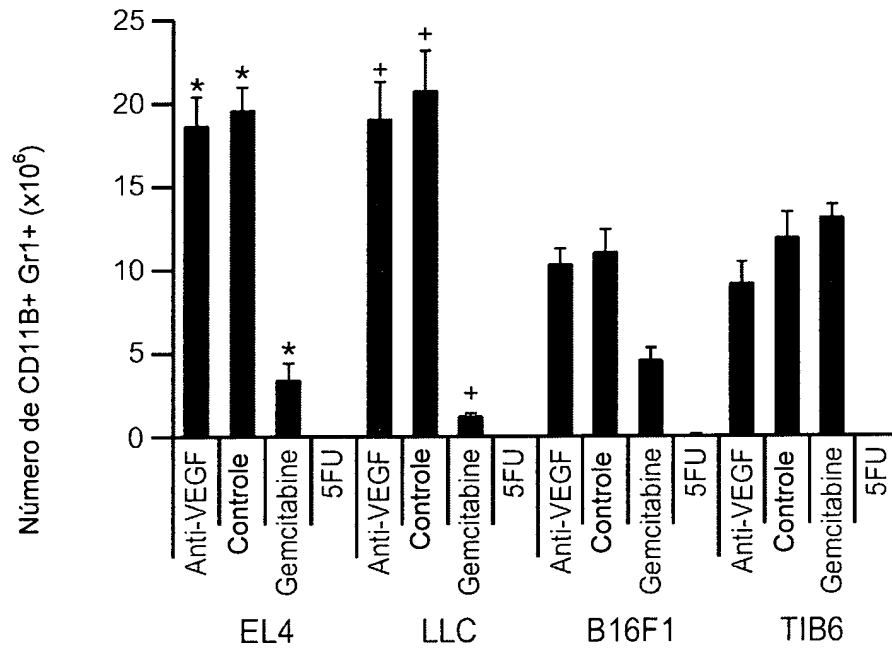
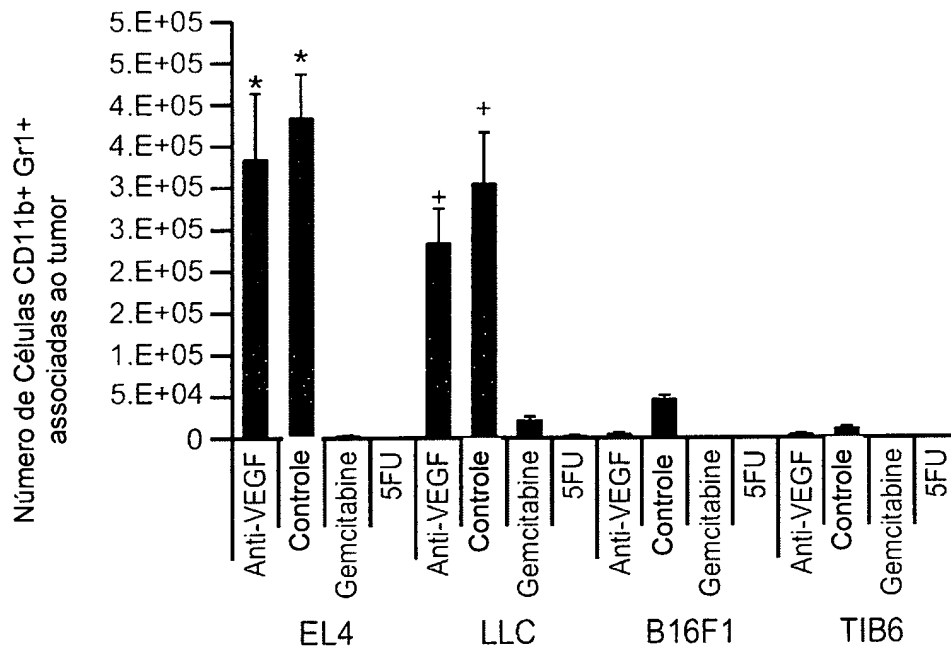


Fig. 17b

**Fig. 18a****Fig. 18b**

**Fig. 18c****Fig. 18d**

**Fig. 18e****Fig. 18f**

RESUMO**“USO DE UM ANTAGONISTA DO VEGF E MÉTODO *IN VITRO* PARA
DIAGNOSTICAR UM TUMOR RESISTENTE”**

A presente invenção se refere a métodos para o tratamento de
5 câncer com terapias combinadas que incluem anticorpos anti-VEGF. São
também fornecidos métodos para diagnosticar tumores resistentes.