

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 604**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2009 PCT/KR2009/004084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10134666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2009 E 09844974 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2433968**

54 Título: **Anticuerpo de dirección doble de forma nueva y uso del mismo**

30 Prioridad:

**20.05.2009 KR 20090044032**

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

**15.03.2017**

73 Titular/es:

**PHARMABCINE INC. (100.0%)  
412 Daejeon Bio Venture Town 461-8, Jeonmin-  
dong Yuseong-gu  
Daejeon 305-811, KR**

72 Inventor/es:

**YOO, JIN SAN;  
LEE, WEON SUP;  
KIM, SUNG WOO y  
SHIM, SANG RYEOL**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 605 604 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo de dirección doble de forma nueva y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo de dirección doble de una forma nueva que tiene un ligando hidrosoluble fusionado al extremo N-terminal de una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo, un ADN que codifica el anticuerpo de dirección doble, un vector de expresión recombinante que contiene el ADN, una célula huésped que se transforma con el vector de expresión recombinante, un método de producción del anticuerpo de dirección doble mediante el cultivo de la célula huésped y una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de dirección doble.

15 **Antecedentes de la técnica**

La angiogénesis se refiere a un mecanismo mediante el que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos preexistentes a través del crecimiento, de la diferenciación y de la migración de las células endoteliales. Se sabe que la angiogénesis desempeña un papel importante en el proceso de crecimiento normal, incluyendo la cicatrización de las heridas y el ciclo menstrual de la mujer (Risau, *Nature*, 386: 671, 1997) y la angiogénesis anormal excesiva desempeña un papel crítico en el crecimiento y en la metástasis de los tumores, y en el ataque de enfermedades tales como la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), la retinopatía diabética, la soriasis, la artritis reumatoide y la inflamación crónica (Carmeliet y Jain, *Nature*, 407: 249, 2000).

En 1971, el Dr. J. Folkman propuso la hipótesis de que el crecimiento y la metástasis de los tumores dependen de la angiogénesis y, por lo tanto, la estrategia terapéutica que se centra en la antiangiogénesis puede implicar un nuevo agente terapéutico para el cáncer sólido. A partir de entonces, ha ido creciendo el interés de muchos investigadores por la investigación asociada con la inhibición del mecanismo de la angiogénesis (Ferrara y Kerbel, *Nature*, 435: 967, 2005). El patrón de la progresión de la angiogénesis está determinado por el equilibrio general entre factores inductores de la angiogénesis y factores inhibidores de la angiogénesis, y tiene lugar a través de procesos complejos y secuenciales de múltiples etapas. Cuando se hace referencia a dicho proceso, en primer lugar, diversos factores inductores de la angiogénesis, incluyendo un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) secretado por los tejidos con tumores o heridas se unen a sus receptores correspondientes en la periferia de las células endoteliales vasculares preexistentes para activar las células endoteliales vasculares, aumentándose así la permeabilidad de las células endoteliales vasculares. Por otra parte, las proteinasas tales como una metaloproteinasa de matriz (MMP) se secretan de digerir la membrana basal y la matriz extracelular alrededor de las células endoteliales vasculares, de modo que las células endoteliales vasculares escapan del vaso capilar preexistente y migran/proliferan hacia los tejidos que secretan el factor inductor de la angiogénesis. Las células endoteliales vasculares que migran y proliferan forman una estructura tubular en el vaso sanguíneo, y finalmente, se forma un vaso sanguíneo estable y maduro como un pericito, que es un soporte estructural de las células endoteliales vasculares que fluye a la estructura tubular. En este caso, se sabe que la angiopoyetina 1 (Ang1) secretada por las células endoteliales vasculares desempeña un papel importante en el flujo de entrada de los pericitos y la estabilización de los vasos sanguíneos mediante la unión a su receptor, Tie-2 (Suri *et al.*, *Cell*, 87: 1171, 1996). Mientras tanto, la angiopoyetina 2 (Ang2), que se sabe que inhibe la interacción de Ang1 y Tie-2, muestra afinidad similar hacia Tie-2 en comparación con Ang1, y por lo tanto, Ang2 puede servir para inhibir competitivamente un proceso de fosforilación inducido por Ang1 (Maisonpierre *et al.*, *Science*, 277:55, 1997). Sin embargo, se ha informado que la Ang2 funciona para inducir la fosforilación de Tie-2 en función de la forma de las células y el método experimental (Kim *et al.*, *Oncogene*, 19:4549, 2000). Además, se ha informado que el vaso sanguíneo se vuelve inestable y las células endoteliales vasculares se vuelven sensibles a los estímulos tales como el VEGF mediante la inhibición de la interacción entre la célula endotelial vascular y el pericito en la etapa temprana de la angiogénesis (Klagsbrun y Moses, *Chem. Biol.*, 6:R217, 1999; Veikkola y Alitalo, *Semin Cancer Biol.*, 9:211, 1999; Carmeliet y Jain, *Nature*, 407:249, 2000). En particular, Ang1 se expresa a un nivel relativamente elevado en los tejidos normales (Maisonpierre *et al.*, *Science*, 277:55, 1997), pero se expresa a nivel bajo en los tejidos tumorales (Hayes *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:1154, 2000). Por otra parte, dado que Ang2 se sobreexpresa en tejidos cancerosos que tienen un alto potencial angiogénico, o en tejidos normales tales como la placenta, el útero y el ovario, cuya remodelación de los vasos sanguíneos tiene lugar de manera activa (Kong *et al.*, *Cancer Res.*, 61:6248, 2001; Ahmad *et al.*, *Cancer*, 92:1138, 2001), se puede presumir que el inicio de la angiogénesis en el tumor se produce cuando Ang2 está presente con un contenido superior a Ang1. Por lo tanto, se supone que Ang2 sirve como un agonista en un mecanismo de señalización de Tie-2. En suma, dado que los mecanismos de señalización de la angiopoyetina y Tie-2 no están claramente identificados, se requieren estudios adicionales para identificar los mecanismos de señalización. Sin embargo, se considera que Ang1 y Ang2 desempeñan papeles importantes y diferentes en la angiogénesis.

La angiopoyetina incluye un dominio N-terminal (dominio N) que consiste en aproximadamente 50 aminoácidos, un dominio de hélice enrollada (dominio C) que consiste en 215 aminoácidos y un dominio de tipo fibrinógeno (dominio F) que consiste en aproximadamente 215 aminoácidos. Entre ellos, los dominios N y C están asociados con la polimerización de la angiopoyetina, y el dominio F se asocia con la unión de un receptor Tie-2 (Davis *et al.*, *Nat.*

*Strut. Biol.*, 10:38, 2003). La fosforilación necesaria para inducir señales de Tie-2 se consigue mediante la dimerización del receptor igual que otros receptores de tirosina quinasa. Del hecho de que la angiopoyetina se ha de multimerizar con este fin (Procopio *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:30196, 1999; Schlessinger, *Cell*, 103:211, 2000), se sugiere que estos ligandos se pueden usar como dianas para el desarrollo de nuevos fármacos usando la inhibición de la angiogénesis. En particular, Davis *et al.* argumentaron que un módulo mínimo de angiopoyetina para la fosforilación de Tie-2 es un tetrámero medido usando una técnica de ingeniería genética, y se puede usar como un antagonista cuando el módulo se compone de dímeros (Davis *et al.*, *Nat. Strut. Biol.*, 10:38, 2003). En otro estudio, se ha informado que una variante dimérica de Ang1 no realiza eficazmente la señalización de Tie-2 (Cho *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 101:5547, 2004). Es decir, aunque no se haya informado de que Ang1 sirve como un antagonista, la inhibición de la señalización de Tie-2 mediante la modificación del patrón oligomérico de esta molécula indica que se puede usar una estrategia para prevenir la multimerización de la angiopoyetina para impedir el mecanismo de señalización de Tie-2. De acuerdo con la estructura de unión publicada de la angiopoyetina y Tie-2, se puede observar que hay un sitio de unión a Tie-2 presente en la angiopoyetina y que la estructura de unión entre Ang1 y Tie-2 es similar a la que hay entre Ang2 y Tie-2 (Barton W. A. *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, 13:524, 2006). Por lo tanto, los presentes investigadores han tratado de inhibir eficazmente la angiogénesis mediante la construcción de un anticuerpo de dirección doble en el que un sitio de unión de Tie-2 a la angiopoyetina, en particular, a Ang2 en la presente invención, se fusiona con un anticuerpo preexistente.

Entretanto, como otra diana para inhibir la angiogénesis, se ha prestado atención a un mecanismo de señalización de VEGF/VEGFR en la presente invención. El VEGF, que se sabe que tiene un efecto significativo en la mayoría de las etapas de un proceso angiogénico, se secreta ampliamente desde una zona hipóxica de una región tumoral. En 1989, el Dr. N. Ferrara, *et al.*, de Genentech, identificaron el VEGF a través del aislamiento y la purificación de proteínas, y la clonación del ADNc (Leung *et al.*, *Science*, 246:1306, 1989). El VEGF denominado VEGF-A se sabe que tiene cuatro isotipos (VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF206). Entre ellos, se ha informado que VEGF165 es abundante en todos los tejidos humanos, a excepción de la placenta (Tisher *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:11947, 1991). Se sabe que el VEGF se une a sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 con una afinidad muy alta, pero induce mecanismos asociados con la angiogénesis tales como la proliferación y la migración de células endoteliales vasculares mediante la transducción de sus señales a través de VEGFR-2. Por esta razón, el VEGF y VEGFR-2 se han dirigido principalmente a inhibir los mecanismos de la angiogénesis inducida por el VEGF, y se han publicado muchos artículos que tratan estos contenidos (Ellis y Hicklin, *Nature Rev. Cancer*, 8:579, 2008; Youssoufian *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 13:5544s, 2007). Por ejemplo, Avastin de Genentech es un anticuerpo humanizado dirigido a VEGF-A (Ferrara *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 333:328, 2005) y fue aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) para el cáncer de colon metastásico en el año 2004, para el cáncer de pulmón no microcítico, en 2006, y para el cáncer de mama metastásico negativo en Her-2, en 2008, respectivamente, y se comenzaron a comercializar. En los últimos años, se han realizado pruebas clínicas exhaustivas en varios tumores sólidos para ampliar las indicaciones. Además, Lucentis, que se encuentra disponible en el mercado a través de la misma empresa, es un anticuerpo producido mediante la digestión de solo un fragmento Fab de Avastin para potenciar su permeabilidad cuando se inyecta Lucentis en la retina para inhibir la angiogénesis excesiva producida bajo la mácula, que es una afección importante de la degeneración macular senil (Eter *et al.*, *BioDrugs*, 20:167, 2006), y fue aprobado en 2006 por la FDA de EE.UU. como un agente terapéutico para el tratamiento de la degeneración macular húmeda relacionada con la edad (DMRE húmeda). Otro anticuerpo terapéutico dirigido a VEGF es la trampa de VEGF de Regeneron (Holash *et al.*, *PNAS*, 99: 11393, 2002). Se trata de un "receptor señuelo" hidrosoluble obtenido mediante la fusión del segundo dominio de inmunoglobulina de VEGFR-1 y el tercer dominio de inmunoglobulina de VEGFR-2 con Fc humano, y no ha sido aprobado por la FDA de EE.UU., y sus ensayos de fase III para el cáncer de mama metastásico, el cáncer de pulmón metastásico, el cáncer de colon metastásico y el cáncer de próstata refractario a las hormonas están en marcha.

Los anticuerpos inhibidores de la angiogénesis dirigidos al receptor de VEGF VEGFR-2 incluyen IMC-1121B (documento EP 1916001A2) de Imclone, CDP-791 (documento PCT/GB02/04619) de UCB y TTAC-0001 (documento PCT/KR07/003077) desarrollado por los presentes investigadores. El IMC-1121B es un anticuerpo monoclonal seleccionado de la biblioteca de Fab humanos completos, y sus ensayos de fase III para el cáncer de mama metastásico están en marcha, y sus ensayos de fase III para el cáncer gástrico están programados para realizarse en 2009. El CDP-791 de UCB es un anticuerpo humanizado, y sus ensayos de fase II para el cáncer de pulmón no microcítico en forma de Di-Fab pegilado están ahora en marcha. Dado que este anticuerpo no contiene un dominio Fc, no se puede esperar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos ni la citotoxicidad dependiente del complemento. Por último, el TTAC-0001, desarrollado por los presentes investigadores y estudiado en una etapa preclínica, es una prueba de detección de anticuerpos monoclonales a partir de la biblioteca completa de scFv humanos. Se trata de un solo anticuerpo que muestra reactividad hacia flk-1 derivado de ratón o de rata (homólogo de VEGFR-2), mientras se dirige al VEGFR-2, y es una de las características importantes que lo diferencian del IMC-1121B de Imclone (PCT/KR07/003077). En particular, la reactividad cruzada con especies cruzadas de TTAC-0001 permite la investigación en un modelo animal de la enfermedad, lo que ayuda a desarrollar un agente antineoplásico para el tratamiento de tumores específicos en el futuro y completar la investigación relacionada con mayor facilidad.

Como tal, la investigación dirigida al VEGF y al VEGFR-2 ha hecho grandes avances en los últimos 5 años, y se han desarrollado diversos agentes terapéuticos en el mercado y en estudios clínicos. Además de desarrollar un

anticuerpo terapéutico usando la inhibición de la angiogénesis, muchos agentes terapéuticos de anticuerpos usando una única diana para cada enfermedad han sido aprobados por la FDA y se han comenzado a comercializar. Por ejemplo, los principales agentes terapéuticos de anticuerpos que lideran el mercado de los anticuerpos monoclonales a nivel mundial incluyen Eribix (Imclone), que se dirige a un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y que se ha comercializado como un agente terapéutico para tratar el cáncer de colon metastásico, Herceptin (Genentech) que se dirige a Her-2/neu y se ha comercializado como un agente terapéutico para tratar el cáncer de mama metastásico, y Rituxan™, que se dirige a CD-20 y se ha comercializado como un agente terapéutico para tratar el linfoma no Hodgkin.

Entretanto, de acuerdo con las recientes tendencias del mercado de los anticuerpos, además de desarrollarse un anticuerpo que tiene la funcionalidad de una sola diana, se ha realizado de manera activa una investigación exhaustiva dirigida a desarrollar el denominado anticuerpo de dirección doble (anticuerpo biespecífico) o anticuerpo de dirección múltiple (anticuerpo multiespecífico), que puede tener dos o más dianas al mismo tiempo (Van Sriel *et al.*, *Immunol. Today*, 21:391, 2000; Kufer *et al.*, *Trend in Biotechnol.*, 22:238, 2004; Marvin y Zhu, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 9:184, 2006). Entre estos anticuerpos que pertenecen a dicha clase, ninguno de ellos está aprobado por la FDA ni se produce en una escala comercial. Sin embargo, estos anticuerpos se han estudiado de manera constante en laboratorio y a niveles clínicos basándose en los intereses continuos y sus potenciales. Los anticuerpos que pertenecen a esta clase se clasifican principalmente en (1) anticuerpos basados en ScFv; (2) anticuerpos basados en Fab; y (3) anticuerpos basados en IgG, etc.

En primer lugar, en el caso del anticuerpo de dirección múltiple basado en ScFv, hay un diacuerpo obtenido mediante la combinación de VL y VH de diferentes ScFv y que tiene un ScFv híbrido en una forma heterodimérica (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6444, 1993). Sin embargo, dicho anticuerpo tiene el problema de una mala estabilidad debida a la afinidad de unión a los heterodímeros. También se han publicado scFv en tándem obtenidos mediante la unión de diferentes ScFv entre sí ((Kipriyanov *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 293:41, 1999; Robinson *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 99:1415, 2008), el ScFv heterodimérico obtenido mediante la expresión de Jun y Fos, que tienen un potencial de unión a los extremos de diferentes ScFv (De Kruijff y Logtenberg, *J. Biol. Chem.*, 271:7630, 1996), un minianticuerpo heterodimérico obtenido mediante la expresión de CH1 y CL de Fab a partir de los extremos de ScFv, respectivamente (Muller *et al.*, *FEBS Lett.*, 432:45, 1998), y un método de construcción de un minicuerpo en una forma de ScFv heterodimérica (Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:677, 1998). En este caso, el método de construcción del minicuerpo incluye la sustitución de algunos aminoácidos de un dominio CH3 que es un dominio homodimérico de Fc para cambiar una estructura heterodimérica en una forma de "botón en ojal" y la expresión de estos dominios CH3 modificados de los extremos de ScFv, respectivamente. Además, se ha publicado una variedad de análogos basados en ScFv en la literatura científica (Kipriyanov y Le Gall, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 7:233, 2004), y también se han publicado en la literatura científica un ScFv de triple diana usando un triacuerpo y un ScFv de cuatro dianas usando un tetracuerpo (Hudson y Kortt, *J. Immunol. Methods*, 231:177, 1999).

En segundo lugar, el anticuerpo de dirección múltiple basado en Fab tiene principalmente la forma de Fab heterodimérico obtenido mediante la combinación de Fab separados contra antígenos específicos entre sí, usando un enlace disulfuro o un mediador (Brennan *et al.*, *Science*, 229:81, 1985; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547, 1992). Entretanto, se ha informado de la producción de un anticuerpo de dirección doble que tiene dos valencias de antígeno mediante la expresión de ScFv contra diferentes antígenos de los extremos de una cadena pesada o una cadena ligera de Fab específico (Schoonjans *et al.*, *J. Immunol.*, 165:7050, 2000; Lu *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 267:213, 2002), y de la producción de un anticuerpo de dirección doble en una forma homodimérica que tiene cuatro valencias de antígeno mediante la interposición de una región bisagra entre Fab y scFv (Coloma y Morrison, *Nat. Biotechnol.*, 15:159, 1997). También se ha publicado en la literatura científica un diacuerpo de dirección doble producido con tres valencias para antígenos mediante la fusión de ScFv contra diferentes antígenos a los extremos de la cadena ligera y la cadena pesada de Fab, y un diacuerpo de dirección triple producido con tres valencias para antígenos mediante la fusión de diferentes ScFv, respectivamente, a los extremos de la cadena ligera y la cadena pesada de Fab (Schoonjans *et al.*, *J. Immunol.*, 165:7050, 2000). Además, también se ha informado de un anticuerpo de dirección triple F(ab')<sub>3</sub> producido de una manera sencilla, conjugando químicamente tres Fab diferentes (Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147:60, 1991).

En tercer lugar, en el caso del anticuerpo de dirección múltiple basado en IgG, se obtuvo un híbrido productor de un anticuerpo de dirección doble, denominado cuadroma, por parte de Trion Pharma mediante la hibridación de hibridomas de ratón y de rata. El anticuerpo de dirección doble Ertumaxomab (antígeno: Her-2/neu, CD3) producido por esta empresa procedió a la fase II de ensayos clínicos para el cáncer de mama metastásico (Kiewe y Thiel, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 17: 1553, 2008), y Catumaxomab (antígeno: EpCAM, CD3) procedió a la fase II de ensayos clínicos para el cáncer gástrico y el cáncer de ovario, y a ensayos de fase III para la ascitis maligna (Shen y Zhu, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 10:273, 2008). Sin embargo, estos anticuerpos no pueden excluir una reacción con anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) ni anticuerpos humanos anti-rata (HARA) causada por su administración repetida. Mientras tanto, también se ha informado de un anticuerpo de dirección doble de "ojales y botón" producido en una forma heterodimérica mediante la modificación de algunos aminoácidos de un dominio homodimérico CH3 de Fc para diferentes cadenas pesadas, a la vez que comparte un dominio de cadena ligera (Merchant *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:677, 1998). Además del anticuerpo de dirección doble en una forma heterodimérica, se ha publicado que (ScFv)<sub>4</sub>-IgG (antígeno: EGFR, IGF-1R) se expresa en una forma homodimérica

mediante la fusión de dos scFv diferentes con los dominios constantes de una cadena ligera y una cadena pesada de IgG, en lugar de los dominios variables de las mismas (Lu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279: 2856, 2004). Sin embargo, este anticuerpo tiene el problema de una productividad muy baja, aunque el mismo grupo de investigación produjo un di-diacuerpo con una mejor productividad contra la misma diana, compensando el problema de (ScFv)<sub>4</sub>-IgG, y confirmando sus potenciales (Lu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280: 19665, 2005). Sin embargo, dicho anticuerpo no resuelve el problema de la baja estabilidad del diacuerpo. También, Shen *et al.* de Imclone produjeron un anticuerpo de dirección doble mediante la fusión de un solo dominio variable para el receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas de ratón (PDGFR  $\alpha$ ) con el extremo N-terminal de una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal quimérico IMC-1C11 contra VEGFR-2 humano, e informaron de sus potenciales (Shen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:10706, 2006; Shen *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 318:65, 2007). Recientemente, Rossi *et al.* propusieron un anticuerpo que tenía múltiples valencias de antígeno para CD20 mediante un método denominado "Dock and Lock (DNL)" usando un dominio de dimerización y acoplamiento (DDD) de una subunidad R de la proteína quinasa A (PKA) y un dominio de anclaje de PKA (Rossi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 103:6841, 2006; Rossi *et al.*, *Cancer Res.*, 68:8384, 2008), y el mismo grupo de investigación informó de un anticuerpo de dirección doble basado en dicha técnica (Chang *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 13:5586, 2007). Se sabe que los anticuerpos que usan el método DNL tienen ventajas en cuanto a que son fáciles de aplicar, se pueden combinar de diversas maneras, ya que se producen en un tipo de módulo, y tienen una excelente estabilidad *in vivo*, pero tienen problemas en cuanto a que pueden ser degradados por la proteinasa *in vivo* y tienen problemas relacionados con la inmunogenicidad.

En Jendreyko *et al.*, *JBC*, vol. 278, n.º 48, pág. 47812-47819, 2003, se describe el diseño, la ingeniería y la caracterización de un intradiacuerpo dirigido al retículo endoplasmático (RE) tetravalente, biespecífico, para la reducción superficial simultánea de dos receptores transmembrana endoteliales, Tie-2 y el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-R2).

El documento WO2008/153237 desvela el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular neutralizante de anticuerpos monoclonales humanos y el uso del mismo. El documento WO2008/153237 desvela además el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular neutralizante de moléculas ScFv humanas y una composición para inhibir la angiogénesis y una composición para tratar el cáncer que contiene las moléculas ScFv humanas. Hasta la fecha, se han publicado diversos anticuerpos de dirección múltiple o de dirección doble en la literatura científica, y estos anticuerpos tienen méritos y deméritos funcionales dependiendo de las características morfológicas de acuerdo con sus usos finales. En particular, la investigación exhaustiva dirigida al desarrollo de anticuerpos de dirección múltiple o de dirección doble terapéuticos para tratar el cáncer ha seguido progresando. Sin embargo, es muy importante seleccionar los antígenos a los que dirigir los anticuerpos obtenidos a través de dicha investigación para que los anticuerpos puedan realizar sus funciones apropiadas.

## Divulgación

### [Problema técnico]

Por lo tanto, para desarrollar un anticuerpo de dirección doble para el tratamiento del cáncer usando la inhibición de la angiogénesis, los presentes inventores han producido un anticuerpo de dirección doble que puede neutralizar dos receptores, VEGFR-2 y Tie-2, que están estrechamente relacionados con el mecanismo de angiogénesis, en una nueva forma de la que no se ha informado hasta la fecha, han confirmado que el anticuerpo muestra un efecto antineoplásico equivalente o mejor incluso *in vivo*, así como a un nivel celular en comparación con un solo anticuerpo dirigido contra VEGFR-2 o Tie 2, y han completado la presente invención.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo de dirección doble de una forma nueva que tiene un ligando hidrosoluble fusionado al extremo N-terminal de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un ADN que codifica el anticuerpo de dirección doble.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un vector de expresión recombinante que contiene el ADN.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una célula huésped transformada con el vector de expresión recombinante.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método de producción de un anticuerpo de dirección doble mediante la incubación de la célula huésped.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de dirección doble.

**[Solución Técnica]**

La presente invención proporciona un anticuerpo de dirección doble según lo descrito en la reivindicación 1, que tiene un ligando hidrosoluble condensado con el extremo N-terminal de la cadena pesada o de la cadena ligera de un anticuerpo.

El término "anticuerpo" usado en la descripción de la presente invención se refiere a una molécula de proteína que es producida por los linfocitos B para reconocer específicamente diversos tipos de antígenos, y sirve como un receptor de antígenos de los linfocitos B. Esta molécula tiene forma de Y, y consiste en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Todas las cadenas ligeras y cadenas pesadas incluyen regiones variables y constantes. Las cuatro cadenas están fijadas por enlaces disulfuro situados en las regiones flexibles de las cadenas pesadas, lo que se denomina región bisagra. Las regiones variables de todas las cadenas pesadas y las cadenas ligeras se unen entre sí para formar dos sitios de unión al antígeno idénticos. Los anticuerpos se clasifican en cinco clases según la región constante de la cadena pesada: A(IgA), D(IgD), E(IgE), G(IgG) y M(IgM). Cada clase se conoce como un isotipo, y tiene características estructurales únicas y diferentes propiedades biológicas. La presente invención incluye anticuerpos de todos los isotipos, y usa preferentemente la IgG.

Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluye un anticuerpo contra un antígeno que se expresa específicamente en una célula neoplásica, una célula del estroma cancerosa, una célula endotelial asociada a un tumor, una célula progenitora endotelial asociada a un tumor, una célula endotelial circulante asociada a un tumor, una célula tumoral circulante, una célula madre cancerosa, etc., pero la presente invención no se limita a las mismas.

Más concretamente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención incluye un anticuerpo contra una proteína expresada en la superficie de una célula tal como un receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1), un receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), un receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-3), una tirosina quinasa 3 de tipo FMS (FLT3), un receptor del c-FMS/factor estimulante de colonias 1 (CSF1R), una célula reorganizada durante la transfección (RET), un factor de transición mesenquimal-epitelial (c-Met), un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Her2/neu, HER3, HER4, receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), un receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), un receptor del factor de células madre (c-KIT), una región de rotura de conglomerados (BCR), integrina, metaloproteinasas de la matriz (MMP), etc., pero la presente invención no se limita a los mismos.

En la presente invención, el anticuerpo puede ser un anticuerpo "policlonal" o "monoclonal", y más preferentemente, un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea. Es decir, los anticuerpos individuales que constituyen dicha población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en una cantidad pequeña. El anticuerpo monoclonal es altamente específico a una sola región antigénica. Por otra parte, a diferencia de los anticuerpos policlonales, que incluyen diferentes anticuerpos para diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se induce contra un solo epítipo en el antígeno. No se ha de interpretar que se requiere el monoclonal para producir un anticuerpo de una manera determinada. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal útil en la presente invención se puede producir mediante un método del hibridoma descrito en Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495(1975) o se puede producir mediante un método de ADN recombinante (véase la patente de EE.UU. n.º 4.816.567). Además, el anticuerpo monoclonal se puede aislar, por ejemplo, de la biblioteca de anticuerpos de fago mediante una técnica descrita en Clackson *et al.*, *Nature*, 352. 629-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991).

El anticuerpo de la presente invención es preferentemente un "anticuerpo humanizado". La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que incluye una secuencia de aminoácidos que se deriva parcial o completamente de la línea germinal de un anticuerpo humano mediante el cambio de la secuencia de un anticuerpo que tiene una región determinante de la complementariedad (CDR) no humana. El uso del método de cambio, es la forma más sencilla de sustituir simplemente una región constante murina con una región constante de un anticuerpo humano. Por lo tanto, se produce una quimera murina/humana, que puede reducir suficientemente la inmunogenicidad tanto como las aplicaciones farmacéuticas lo permitan. Sin embargo, se prefiere la humanización de la región variable e incluso de la CDR del anticuerpo mediante una técnica conocida en la materia. La región marco conservada de la región variable se sustituye con una región marco conservada humana correspondiente, mientras que la CDR no humana se mantiene esencialmente intacta o la CDR se intercambia con una secuencia derivada del genoma humano. Un anticuerpo humano intacto se produce en un ratón modificado transgénicamente cuyo sistema inmune se modifica para corresponderse con el sistema inmunológico humano.

En particular, se prefiere que el anticuerpo de la presente invención sea un "anticuerpo humano". El anticuerpo humano es un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo producido por cualquier técnica para la producción de un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo humano. El anticuerpo humano se puede producir mediante varias técnicas conocidas en la materia. De acuerdo con una realización, el anticuerpo humano se selecciona de la biblioteca de fagos que expresa un anticuerpo humano (Vaughan *et al.* *Nature Biotechnology* 14:309-314(1996); Sheets *et al.* *PNAS*

(EE.UU.) 95:6157-6162(1998); Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991); Marks *et al. J. Mol. Biol.* 222:581(1991)). El anticuerpo humano se puede producir mediante la introducción de un locus de inmunoglobulina humana en un animal transformado, por ejemplo, un ratón, cuyos genes de inmunoglobulina endógenos están parcial o completamente inactivados. Durante la exposición, se observó que se produjo un anticuerpo humano que era muy similar al observado en el ser humano en todos los aspectos del reordenamiento génico, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016 y Marks *et al. Biotechnology* 10:779-783(1992); Lonberg *et al. Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild *et al. Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93(1995). En otro método, el anticuerpo humano se puede producir mediante la inmortalización de linfocitos B humanos (por ejemplo, se pueden extraer linfocitos B de una población o inmunizar *in vitro*), lo que produce un anticuerpo inducido contra un antígeno diana (Cole *et al. "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy"*, Alan R. Liss, pág. 77(1985); Boerner *et al. J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991); y patente de EE.UU. n.º 5.750.373).

La expresión "ligando hidrosoluble" usado en la descripción de la presente invención significa una parte o la totalidad de una proteína que se une específicamente a un receptor presente en una célula, en particular, en la superficie de una célula, y que muestra una propiedad hidrosoluble por la que puede ser soluble en agua. Por ejemplo, el ligando hidrosoluble incluye, pero sin limitación, un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento epidérmico (EGF), un factor de crecimiento de placenta (P1GF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), angiopoyetina, etc.

En el anticuerpo de dirección doble de una forma nueva de acuerdo con la presente invención, el anticuerpo y el ligando desempeñan sus funciones exclusivas.

Sin embargo, el anticuerpo de dirección doble puede inhibir o amplificar dos señales al mismo tiempo, y por lo tanto, puede ser más eficaz en comparación con un caso en el que se inhiba o amplifique una sola señal. En comparación con un caso en el que cada señal se trata con un inhibidor de la señal, se puede administrar una dosis baja, y se pueden inhibir o amplificar dos señales en el mismo tiempo y espacio.

En la presente invención, se prefiere que el anticuerpo se fusione con un ligando hidrosoluble a través de un enlazador. En la presente invención, el término "enlazador" se refiere a un fragmento peptídico que conecta dos fracciones de una proteína de fusión. En la presente invención, un enlazador adecuado incluye un péptido que tiene de 5 a 25 aminoácidos, preferentemente de 10 a 20 aminoácidos, y más preferentemente de 10 a 15 aminoácidos.

Para producir el anticuerpo de dirección doble de la presente invención, se produce una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de dirección doble. La secuencia de ácido nucleico se puede construir mediante la fusión del extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico que codifica un ligando hidrosoluble con el extremo 5' de una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de dirección doble fusionado a través del enlazador se puede obtener mediante el diseño de una secuencia de ácido nucleico de un enlazador que esté contenido en un cebador y la realización de la PCR.

Se liga un gen codificante del anticuerpo de dirección doble producido de este modo en un vector para preparar un plásmido de expresión recombinante, se introduce el plásmido en una célula huésped para preparar una célula transfectante o transformante, se amplifica y se incuba la célula huésped, y se aísla y purifica un anticuerpo de dirección doble, obteniéndose de este modo el anticuerpo de dirección doble deseado.

En la presente invención, la célula huésped usada para la expresión del anticuerpo de dirección doble puede ser una célula procariota o eucariota. También, en general, se usa una célula huésped en la que se introduce un ADN con alta eficiencia y que tiene alta eficiencia de expresión del ADN introducido. Los ejemplos de la célula huésped incluyen huéspedes eucariotas y procariotas conocidos, tales como *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., bacterias y levaduras, células de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9), células animales tales como células de ovario de hámster chino (CHO) y una célula de ratón, COS1, COS7, células de riñón embrionario humano 293, células de mono verde africano tales como BSC 1, BSC 40 y BMT 10, y células humanas en cultivo tisular.

En la presente invención, se puede usar una variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión para expresar el anticuerpo de dirección doble. Por ejemplo, los vectores de expresión adecuados para el huésped eucariota incluyen SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus, virus adenoasociado, citomegalovirus y retrovirus. Los vectores de expresión que se pueden usar para el huésped bacteriano incluyen plásmidos bacterianos tales como pBluescript, pGEX2T, pUC, pCR1, pBR322, pMB9 y derivados de los mismos, un plásmido tal como RP4 que tiene una selección de huéspedes más amplia,  $\lambda$ gt10 y  $\lambda$ 11, ADN de fago representado como diversos derivados del fago  $\lambda$  tales como NM989, y otros fagos de ADN tales como M13 y fago de ADN monocatenario filamentoso. Los vectores de expresión útiles en células de levadura incluyen el plásmido 2 $\mu$  y derivados del mismo. Un vector útil en células de insecto es pVL941.

La transformación de un vector de expresión recombinante en una célula huésped incluye, por ejemplo, transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación, transducción, transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por lípidos catiónicos, carga por raspado e infección.

5 En la presente invención, la célula huésped se puede incubar en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión y/o el aislamiento del anticuerpo de dirección doble usando fermentación a pequeña o gran escala e incubación en matraz de agitación en un laboratorio o fermentador industrial. La incubación se realiza en un medio de cultivo adecuado que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno, y sales inorgánicas mediante una técnica conocida. El medio adecuado se encuentra disponible en el mercado y, por ejemplo, se puede preparar usando los  
10 componentes y las proporciones en la composición que se describen en el catálogo de la colección americana de cultivos tipo (ATCC).

El anticuerpo de dirección doble se puede aislar de este caldo de cultivo mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo de dirección doble se puede aislar de este caldo de cultivo usando un método  
15 convencional, incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Además, el anticuerpo de dirección doble se puede purificar usando diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo cromatografía (es decir, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba y exclusión de tamaño), electroforesis, fraccionamiento (es decir, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción.

20 La composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar en moléculas específicas a través de cualquier vía adecuada. La composición de acuerdo con la presente invención se puede usar en el método para tratar directamente (por ejemplo, a nivel local en forma de inyección, inyección subcutánea o administración local en las zonas de tejido) o de forma sistémica (por ejemplo, por vía parenteral u oral) a animales, incluyendo un ser humano, usando cualquier medio adecuado. Cuando la composición de acuerdo con la presente invención se  
25 proporciona para su uso en un método parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, ocular, intraperitoneal, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracerebelar, intravesical, intranasal o por pulverización, la composición incluye preferentemente una parte de una suspensión o solución de fluido acuoso o compatible fisiológicamente. Por lo tanto, cuando hay un vehículo o un excipiente fisiológicamente disponible, no debería tener ningún efecto negativo en el electrolito ni/o en el balance de  
30 volumen de los pacientes, además de la administración de una composición deseada a los pacientes.

Una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de dirección doble de la presente invención se puede formular en una formulación oral, tal como polvo, gránulo, comprimido, cápsula, suspensión, emulsión, jarabe o aerosol, solución inyectable estéril, supositorio y preparado percutáneo de acuerdo con métodos convencionales,  
35 que se puede usar más tarde. El vehículo, el excipiente y el diluyente que se pueden incluir en la composición pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa amorfa, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Cuando sea necesario, la composición puede formularse con un diluyente o excipiente tal como carga, agente de extensión, aglutinante, agente humectante, agente de desintegración o tensioactivo.

En un aspecto, el anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención se puede formular en un preparado sólido oral. El preparado sólido para la administración oral incluye un comprimido, una píldora, un polvo, un gránulo, una cápsula o similares. En este caso, el preparado sólido se puede formular mediante la mezcla de al  
45 menos un excipiente, por ejemplo, almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa o gelatina con el extracto. Además del excipiente sencillo, también se pueden usar lubricantes tales como estearato de magnesio y talco.

En otro aspecto, la composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención también se puede formular en un preparado líquido para la administración oral. El preparado  
50 líquido para la administración oral incluye suspensión, líquido para uso interno, emulsión, jarabe, etc. Dicho preparado líquido puede incluir diversos excipientes tales como, por ejemplo, agente humectante, agente edulcorante, aromático, conservante, etc., además de los diluyentes inertes usados en general (por ejemplo, agua destilada, etanol, parafina líquida).

En otro aspecto más, la composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención se puede formular en un preparado para la administración parenteral, preferentemente para la administración intraperitoneal. El preparado para la administración parenteral incluye solución acuosa estéril,  
60 disolvente no acuoso, suspensión, emulsión, preparado liofilizado y supositorios. La solución acuosa estéril que se puede usar en el presente documento incluye una solución de Hank, una solución de Ringer o una solución tampón adecuada tal como solución salina tamponada físicamente, y la suspensión como el disolvente no acuoso que puede usarse en el presente documento incluye aceite vegetal tal como propilenglicol, polietilenglicol o aceite de oliva, o un éster inyectable tal como oleato de etilo. Cuando sea necesario, se pueden usar un agente antiséptico, agente estabilizante, humectante o emulsión, y sales y/o tampón para la regulación de la presión osmótica. Entretanto, en el caso del supositorio, se puede usar una base convencional tal como Witepsol, Macrogol, Tween 61, aceite de cacao,  
65 manteca de laurina o gelatina glicerina.



Lo más preferentemente, el anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención es DIG 0001 producido de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 Basándose en el TTAC0001 descrito en la publicación internacional n.º PCT/KR07/003077, la producción del anticuerpo de dirección doble DIG 0001 de acuerdo con la presente invención se completó mediante la fusión de un dominio de unión de Ang2, que se une a Tie-2 a través de un enlazador específico, a una región amino-terminal de la cadena ligera del anticuerpo (Ejemplos 1 y 2).

10 Se confirmó la inmovilidad del anticuerpo de dirección doble DIG 0001 así producido a través de métodos tales como SDS-PAGE y transferencia Western, y solo un anticuerpo, que se purificó hasta al menos el 95 % de pureza mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando una columna de afinidad de proteína A, una columna de SP-Sefarosa o una columna de exclusión por tamaño, se fijó para un posterior examen exhaustivo (Ejemplo 3).

15 Se confirmó la afinidad de unión del anticuerpo de dirección doble DIG 0001 purificado como se ha descrito anteriormente con VEGFR-2 D1 a D3-Fc y Tie-2-Fc por medio de un ensayo de unión usando ELISA, y se realizó un ensayo competitivo en VEGF165 y Ang2 por medio de ELISA para confirmar la funcionalidad como anticuerpo de dirección doble (Ejemplo 4).

20 De acuerdo con la presente invención, a través del ensayo de viabilidad celular en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en cultivo primario, se confirmó que el anticuerpo de dirección doble DIG 0001 puede inhibir la viabilidad de las células HUVEC inducida bien por VEGF o Ang1, y también puede inhibir eficazmente la viabilidad de las células HUVEC inducida por tanto por VEGF como por Ang1 (Ejemplo 5).

25 A través del ensayo de migración celular, se confirmó que el anticuerpo de dirección doble DIG 0001 de acuerdo con la presente invención puede inhibir la movilidad de las células HUVEC inducida por VEGF o Ang1, y también puede inhibir eficazmente la movilidad de las células HUVEC inducida tanto por VEGF como por Ang1 (Ejemplo 6).

30 A través de la transferencia Western, se confirmó que el anticuerpo de dirección doble DIG 0001 de acuerdo con la presente invención puede inhibir el mecanismo de señalización de Tie-2 inducido por Ang1 y el mecanismo de señalización de VEGFR-2 inducido por VEGF, y también se confirmó que el anticuerpo de dirección doble DIG 0001 puede inhibir los mecanismos de señalización inducidos por VEGF y Ang1 al mismo tiempo usando la transferencia Western (Ejemplo 7).

35 En particular, se confirmó que, cuando el anticuerpo de dirección doble DIG 0001 de acuerdo con la presente invención se usó para la administración a un modelo animal de glioblastoma, se redujo significativamente el volumen de un tumor (Ejemplo 8).

40 El anticuerpo mencionado anteriormente se produjo usando el siguiente método. En primer lugar, se amplificó una secuencia de ADN de un dominio de unión de Ang2 para Tie-2, que puede servir como antagonista de Tie-2, mediante PCR. En este caso, el anticuerpo se diseñó para que incluyera un ADN enlazador en el extremo 3' del fragmento de ADN amplificado. La producción del anticuerpo de dirección doble que puede unirse específicamente a VEGFR-2 y a Tie-2 se completó mediante la fusión del fragmento de ADN al extremo 5' de una secuencia de ADN de la cadena ligera de TTAC0001 que contenía parte de un ADN enlazador.

45 El anticuerpo de dirección doble DIG 0001 de acuerdo con la presente invención se puede usar en un método de tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis mediante la inhibición de la angiogénesis.

50 De acuerdo con la presente invención, la expresión "enfermedad relacionada con la angiogénesis" incluye, pero sin limitación, cáncer, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, retinopatía diabética, soriasis e inflamación crónica.

55 De acuerdo con la presente invención, el cáncer incluye, pero sin limitación, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, melanoma, cáncer metastásico de hueso a partir del cáncer de próstata, cáncer de ovario y leucemia.

60 El anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente en un método para prevenir, inhibir o aliviar la progresión de un tumor, por ejemplo, el crecimiento, la invasión, la metástasis y (o) la recaída de un tumor con el fin de tratar terapéuticamente pacientes con cáncer. Para lograr este fin, la cantidad adecuada para su uso en el método descrito se define como una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad eficaz para su uso en dicha aplicación dependerá de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmune del paciente.

65 Un contenido preferido de acuerdo con la presente invención está en un intervalo de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, y más preferentemente de 0,1 mg/m<sup>2</sup> a 10 mg/m<sup>2</sup>.

Sin embargo, una dosis óptima varía de acuerdo con la enfermedad que se vaya a tratar, y la presencia de efectos secundarios, y se puede determinar a través de experimentos convencionales. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento se puede administrar mediante inyecciones periódicas de píldoras o inyecciones intravenosas o intraperitoneales continuas desde un recipiente externo de almacenamiento (por ejemplo, una bolsa venosa) o en un recipiente interno de almacenamiento (por ejemplo, un implante biodegradable). Además, un anticuerpo proteico de acuerdo con la presente invención para su uso en el método descrito se puede administrar en combinación con una variedad de diferentes moléculas biológicamente activas. Sin embargo, se pueden determinar una combinación óptima de anticuerpo proteico y del resto de moléculas, un método de administración y una dosis por medio de experimentos convencionales en el nivel técnico de los expertos en la materia.

La composición de acuerdo con la presente invención se puede usar en combinación con otros agentes terapéuticos o mezclarse con los otros agentes terapéuticos.

Cuando el anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención para su uso en un método de tratamiento de tumores, incluyendo tumores humanos, se usa en combinación con un agente quimioterapéutico, radiación o un antagonista del receptor adicional o combinaciones de los mismos, se puede lograr un efecto sinérgico. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral causado por el anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención se puede mejorar de forma inesperada cuando se usa con el agente quimioterapéutico, la radiación o el antagonista del receptor adicional, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el efecto sinérgico se puede ilustrar mediante una inhibición del crecimiento del tumor que se espera a partir del uso de la terapia de combinación superior a la esperada a partir del anticuerpo de dirección doble usado en un método de tratamiento de acuerdo con la presente invención y el agente quimioterapéutico, la radiación o el antagonista del receptor adicional. Preferentemente, el efecto sinérgico se demuestra debido al alivio del cáncer, que no se esperaba paliar mediante el tratamiento con una combinación del anticuerpo de dirección doble de la presente invención y el agente quimioterapéutico, o el antagonista del receptor adicional.

El anticuerpo de dirección doble de la presente invención para su uso en un método de tratamiento se administra antes del inicio de la quimioterapia o la radioterapia, después del inicio de dichas terapias, y antes y durante el inicio de una combinación de las mismas, es decir, la quimioterapia y/o radioterapia, antes y después del inicio de dichas terapias, durante y después del inicio de dichas terapias, o antes, durante y después del inicio de dichas terapias. Por ejemplo, el anticuerpo DIG 0001, en general, se usa para la administración de 1 a 30 días, preferentemente, de 3 a 20 días y más preferentemente de 5 a 12 días antes del inicio de la radioterapia y/o quimioterapia.

Por lo tanto, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención se usa *in vivo* e *in vitro* con fines de investigación, en un método de prevención o tratamiento ampliamente conocido en la técnica. Por supuesto, es evidente que el principio de la presente invención descrita en el presente documento puede ser cambiado y modificado por los expertos en la materia, y dichos diversos cambios y modificaciones se pueden realizar sin apartarse del alcance de la presente invención.

#### [Efectos ventajosos]

La presente invención proporciona un anticuerpo de dirección doble como se define en la reivindicación 1, que puede inhibir de manera eficaz un mecanismo de señalización relacionado con la angiogénesis neutralizando a la vez los receptores VEGFR-2 y Tie-2 asociados con la angiogénesis, y una composición para su uso en un método de inhibición de la angiogénesis y tratamiento del cáncer, que incluye el anticuerpo de dirección doble. El anticuerpo de dirección doble de acuerdo con la presente invención muestra un excelente potencial de neutralización, y también es eficaz en el tratamiento del cáncer, en comparación con los anticuerpos de una sola dirección preexistentes, mediante la neutralización de dos dianas asociadas a la angiogénesis a la vez. Para las dos dianas correlacionadas entre sí, cabe esperar efectos mucho mejores que el beneficio real derivado del tratamiento con el anticuerpo de una sola dirección mediante la construcción de un anticuerpo de dirección doble de una nueva forma ideada por los presentes inventores.

#### Descripción de las figuras

Estas y otras características, aspectos y ventajas de realizaciones preferidas de la presente invención se describirán de manera más completa en la siguiente descripción detallada, tomando las figuras adjuntas. En las figuras:

La FIG. 1 muestra una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 6) y las funciones de un gen insertado en un vector pIgGLD-mAng2-TTAC0001 lgt.

La FIG. 2 muestra esquemáticamente un método de construcción de un vector pIgGLD-mAng2-TTAC0001 Ig de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 3 muestra los resultados obtenidos mediante la expresión al azar del vector de acuerdo con la presente invención en células CHO-DG44 y la determinación de la producción de un anticuerpo de dirección doble DIG 0001 a través de transferencia Western.

La FIG. 4 muestra los resultados del rastreo de un clon de alta productividad con el tratamiento MTX repetido (hasta 700 nM) para establecer una línea celular de alta productividad de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 5 muestra los resultados de SDS-PAGE de DIG 0001 purificado.

La FIG. 6 muestra los resultados del análisis de un ensayo competitivo en VEGF y Ang-2-Fc usando DIG 0001 por medio de ELISA.

5 La FIG. 7 muestra los resultados de un ensayo de supervivencia que demuestra la viabilidad de DIG 0001 de acuerdo con la presente invención en HUVEC.

La FIG. 8 muestra los resultados de un ensayo de migración que demuestran la movilidad de DIG 0001 de acuerdo con la presente invención en HUVEC.

10 La FIG. 9 muestra los resultados que demuestran la actividad inhibidora de la fosforilación de VEGFR-2 y ERK por parte de VEGF del anticuerpo de dirección doble DIG 0001 de acuerdo con la presente invención, y la actividad inhibidora de la fosforilación de Tie-2, ERK y AKT por parte de Ang1 del mismo anticuerpo.

La FIG. 10 muestra los efectos de DIG 0001 de acuerdo con la presente invención en la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de ratón de glioblastoma.

[Modo de la invención]

15 De aquí en adelante, los siguientes ejemplos solo se describirán para explicar la presente invención de manera más concreta, y será evidente para los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención que el alcance de la presente invención no se limita a los ejemplos, en función del fin de la presente invención.

20 Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión para producir DIG 0001.

Se amplificó mediante PCR un ADN relacionado con el dominio de unión de Ang2 en unión con Tie-2. Con este fin, una línea celular HEK293 productora de Ang2-RBD humano (Barton *et al.*, *Structure*, 13:825, 2005) fue proporcionada amablemente por el Dr. B. Dimitar Nikolov del Centro Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de EE.UU., y se extrajo el ADN genómico, que se usó como molde. Para amplificar solamente un dominio de unión de Ang2 (F281-F496) a partir del ADN extraído, la PCR se realizó en las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C durante 4 minutos, 30 ciclos (a 94 °C durante 45 segundos/a 50 °C durante 45 segundos/a 72 °C durante 1 minuto), un ciclo a 72 °C durante 7 minutos y a 4 °C para ∞. La composición de los reactivos usados en el presente documento fue la siguiente: 2 μl (10 pmol/μl) de un cebador F-ksw001 que tenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción BstXI (5'- CAC TCC AGC GGT GTG GGT TCC TTC AGA GAC TGT GCT GAA GTA TTC, SEQ ID NO: 1), 2 μl (10 pmol/μl) de un cebador inverso R'-ksw001 (5'-ACT ACC TCC GCC TCC TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, SEQ ID NO: 2), 1 μl (100 ng/μl) de ADN genómico usado como molde de ADN, 2,5 U de i-Max™ II Taq (Intron n.º 25261, Corea) usada como una polimerasa, 5 μl de 10 x tampón, 2 μl (2,5 mM de cada) de dNTP, y 37,5 μl de agua destilada. Se sometió el producto obtenido a través de la PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y luego se aisló una banda débil por debajo de 700 pb usando un kit de extracción de ADN de Gel/PCR HiYield™ (RBC Bioscience n.º YDF300, Taiwán). Se volvió a realizar la PCR de nuevo usando el ADN aislado como un molde para obtener un fragmento de dominio de unión de Ang2 que tenía un enlazador fusionado al mismo (denominado "mAng2"). El método de PCR usado en el presente documento se realizó de la misma manera que en el método anterior, a excepción del uso de R-ksw001 (5'- GGA GCC TCC TCC GCC ACT ACC TCC GCC TCC TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, SEQ ID NO: 3) como cebador inverso.

Entretanto, se amplificó una región de cadena ligera de TTAC0001 usado para fusionar el dominio de unión de Ang2 mediante PCR en las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C durante 4 minutos, 30 ciclos (a 94 °C durante 30 segundos/a 50 °C durante 30 segundos/a 72 °C durante 30 segundos), un ciclo a 72 °C durante 5 minutos y a 4 °C para ∞. La composición de los reactivos usados en el presente documento fue la siguiente: 2 μl (10 pmol/μl) de un cebador F-ksw002 al que se ha añadido parte del enlazador (5'- AGT GGC GGA GGA GGC TCC GGT TCC AAT TTT ATG CTG ACT CAG, SEQ ID NO: 4), 2 μl (10 pmol/μl) de un cebador R'-ksw002 que contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción BstXI (5'-CAG ATC TTT CCA CGA GGC TGG CTC CTC, SEQ ID NO: 5), 10 ng de pIgGLD-TTAC0001 Lgt (PCT/KR07/003077) usado como molde de ADN, 2,5 U de i-Max™ II Taq (Intron n.º 25261, Corea) usada como una polimerasa, 5 μl de 10 x tampón, 2 μl de dNTP (2,5 mM de cada) y 37,5 μl de agua destilada. Se sometió el producto obtenido a través de la PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y se aisló un fragmento de cadena ligera de TTAC0001 correspondiente a aproximadamente 350 pb usando un kit de extracción de ADN de Gel/PCR HiYield™ (RBC Bioscience n.º YDF300, Taiwán) (que se denomina "TTAC0001 lgt").

Se realizó una SOE-PCR para fusionar una región de cadena ligera de TTAC0001 (TTAC0001\_lgt) con una región de fragmento de Ang2 (mAng2) obtenida a través de la PCR. Las condiciones de la PCR usadas en el presente documento fueron las siguientes: un ciclo a 94 °C durante 4 minutos, 30 ciclos (a 94 °C durante 45 segundos/a 50 °C durante 45 segundos/a 72 °C durante 1 minuto), un ciclo a 72 °C durante 7 minutos y a 4 °C para ∞. Además, la composición de los reactivos usados en el presente documento fue la siguiente: 2 μl (10 pmol/μl) de un cebador F-ksw001 que tenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción BstXI, 2 μl (10 pmol/μl) de un cebador R'-ksw002, 10 ng de cada de mAng2 y TTAC0001 lgt como moldes de ADN, 2,5 U de i-Max™ II Taq (Intron n.º 25261, Corea) usada como una polimerasa, 5 μl de 10 x tampón, 2 μl de dNTP (2,5 mM de cada) y 37,5 μl de agua destilada. Se sometió el producto obtenido a través de la PCR a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y luego se aisló un producto de PCR fusionado con mAng2-TTAC0001 lgt correspondiente a aproximadamente 1 kb usando un

kit de extracción de ADN de Gel/PCR HiYield™ (RBC Bioscience n.º YDF300, Taiwán) (que se denominó "mAng2-TTAC0001 lgt". Se insertó el producto aislado de PCR en un vector T usando un kit de clonación TA TOPcloner (Enzymonics # EZ111, Corea), y se transformó en DH5α de *Escherichia coli*. A continuación, se minipreparó la *E. coli* transformada, y se trató con una enzima de restricción BstXI. Tras ello, se externalizó un vector que contenía un ADN diana con aproximadamente 1 kb y se secuenció para confirmar su secuencia de bases de ADN (FIG. 1 y SEQ ID NO: 6.).

Un método de construcción de un vector de expresión de cadena ligera para la expresión del anticuerpo de dirección doble DIG 0001 es el siguiente (FIG. 2). En primer lugar, se digirió un vector de expresión de cadena ligera TTAC0001 plgGLD-TTAC0001 Lgt (PCT/KR07/003077) en poder de los presentes investigadores con BstXI, y se separó un fragmento que podía usarse como vector a través de la electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Además, el vector T en el que se insertó mAng2-TTAC0001 lgt también se digirió con BstXI, y solo se separó un fragmento digerido del gel de agarosa al 1 % a través de la electroforesis. Tras ello, se mantuvieron los dos fragmentos separados en presencia de una ADN ligasa de T4 (Enzymonics n.º M001S, Corea) a 4 °C durante aproximadamente 12 horas para construir un vector intacto. A continuación, se transformó DH5α de *E. coli* con el vector construido, se minipreparó y luego se digirió con BstXI para confirmar si se había insertado o no mAng2-TTAC0001 lgt en el vector construido. El vector recombinante confirmado se denominó "plgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt".

#### Ejemplo 2: Producción e identificación de DIG 0001

Se sometieron conjuntamente a transducción el vector de expresión de cadena ligera construido plgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt y el vector de expresión de cadena pesada preexistente plgGHD-TTAC0001 Hvy (PCT/KR07/003077) en células CHO-DG44 (CHO deficientes en dhfr) para inducir su expresión voluntaria, y la expresión se confirmó mediante SDS-PAGE y transferencia Western. La transducción realizó usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen n.º 11668-019, EE.UU.), y su procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se inocularon  $5 \times 10^5$  células CHO-DG44 en cada pocillo de una placa de 6 pocillos que contenía un medio αMEM (Welgene, Corea), y se incubaron densamente hasta que se alcanzó una densidad celular del aproximadamente 80 al 90 %, manteniendo las células CHO-DG44 a 37 °C durante 24 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub> (5 %) con humedad. Se diluyeron 3 μg de un vector recombinante (1,5 μg de plgGHD-TTAC0001 Hvy y 1,5 μg de plgGLD-mAng2-TTAC0001 Lgt) y 6 μl de lipofectamin™ 2000 en cada 250 μl de los medios de αMEM exentos de suero, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se mezclaron una solución diluida de ADN y una solución diluida de Lipofectamin™ 2000 y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos para formar un complejo de ADN-Lipofectamin™ 2000. Se retiró el medio preexistente de las células cultivadas, y se añadieron 500 μl del complejo de ADN-Lipofectamin™ 2000 y 500 μl de un medio αMEM exento de suero a cada pocillo, y se incubó a 37 °C durante 6 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Se añadió 1 ml de un medio de αMEM que contenía suero bovino fetal dializado al 20 %, y se incubaron durante 48 a 72 horas. Tras ello, solo se separó un sobrenadante, y la expresión del anticuerpo se confirmó usando SDS-PAGE y transferencia Western (FIG. 3). La SDS-PAGE y la transferencia Western se realizaron de acuerdo con el método ampliamente usado en la técnica, y las muestras usadas fueron las siguientes: gel de SDS-poliacrilamida al 12 % una membrana de PVDF (Millipore n.º IPVH00010, EE.UU.), un anticuerpo anti-IgG humana (kappa) de cabra conjugado con HRP y un anticuerpo anti-IgG humana (Fc) de cabra conjugado con HRP (Pierce, EE.UU.).

#### Ejemplo 3: Establecimiento de la línea celular para la producción de DIG 0001, y la separación y purificación de anticuerpo

Se estableció una línea de células productoras de DIG 0001 usando células CHO-DG44 (CHO deficientes en dhfr). Se realizó un procedimiento de transducción para el establecimiento de una línea de células CHO-DG44 que expresaban anticuerpos recombinantes de la misma manera como se ha descrito anteriormente. Para detectar las células CHO-DG44 transducidas (positivas en dhfr), se usó un medio de αMEM exento de hipoxantina-timidina, y se usaron 500 μg/ml de G418 (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 400 μg/ml de zeocina (Invitrogen, EE.UU.) como marcadores de selección para detectar principalmente las células CHO-DG44 transducidas. Con el fin de obtener una colonia monoclonal en la que se expresó el anticuerpo recombinante, se diluyeron las células detectadas primariamente a una densidad de 10 células/ml, y se inocularon en una placa de 96 pocillos (Nunc, EE.UU.). A continuación, se incubaron las células diluidas durante 2 semanas, y se separó una sola colonia de diferenciación de una sola célula para establecer un clon de células madre. Para obtener una línea celular de alta expresión, se subcultivó el clon de células madre secuencialmente de 3 a 5 veces en un medio suplementado con diversas concentraciones (40 nM, 80 nM, 160 nM, 320 nM y 700 nM) de metotrexato (MTX), y se confirmó su nivel de expresión mediante ELISA. Con este fin, se añadieron 2 μg/ml de un anticuerpo primario, anticuerpo de cabra anti-IgG humana (Fc) (Pierce, EE.UU.), a una concentración de 100 μl a la placa de 96 pocillos, y se mantuvo a 4 °C durante 12 horas para completar el procedimiento de recubrimiento. A continuación, se desechó la solución que quedó en cada pocillo, se añadieron 200 μl de una solución de bloqueo que contenía leche desnatada al 2 % con 1 x PBS a cada pocillo, y se mantuvieron a 37 °C durante 1 hora. Se lavó cada pocillo repetidamente tres veces con un tampón de lavado que contenía Tween-20 al 0,05 % con 1 x PBS, y después se añadieron 100 μl de un caldo de cultivo celular obtenido a partir de la línea celular CHO-DG44 con expresión del anticuerpo, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó cada pocillo de nuevo tres veces con un tampón de lavado, y, entonces, se diluyó un

anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG humana ( $\kappa$ ) conjugado con HRP, con un tampón de lavado en una proporción de 1:5.000, y se hicieron reaccionar 100  $\mu$ l de la solución de anticuerpo resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó cada pocillo de nuevo tres veces con un tampón de lavado, y se añadieron 100  $\mu$ l de un reactivo de sustrato de TMB (BD biosciences, EE.UU.), y se hicieron reaccionar durante de 5 a 10 minutos. A continuación, se añadieron 50  $\mu$ l de una solución de ácido sulfúrico 2 N ( $H_2SO_4$ ) para detener una reacción cromogénica. Se midió un valor de densidad óptica (de DO) a 450 nm a 650 nm usando un lector de microplacas (Tecan, Suiza). Para volver a confirmar los resultados, el ELISA se realizó de la misma manera que se ha descrito anteriormente usando VEGFR-2 y Tie-2 como anticuerpos primarios y anticuerpo de cabra anti-IgG humana ( $\kappa$ ) conjugado con HRP como anticuerpo secundario. Por último, se estableció un clon que mostraba una alta tasa de expresión en MTX 700 nM como una línea celular de alta expresión (FIG. 4). La incubación de la línea celular de alta expresión se realizó en un medio de  $\alpha$ MEM (Welgene, Corea) suplementado con suero bovino fetal dializado al 10 % (KDR, Corea), 100 unidades/ml de penicilina (Hyclone, EE.UU.) y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin (Hyclone, EE.UU.), y se realizó el cultivo de células en una incubadora a 37 °C en condiciones de aire mezclado con  $CO_2$  al 5 % con humedad.

Se sometió el anticuerpo de dirección doble DIG 0001 obtenido a partir de la incubación de la línea celular de alta expresión a FPLC con una columna de afinidad de proteína A, una columna de SP-Sefarosa o una columna de exclusión por tamaño para garantizar solamente un anticuerpo, que se purificó hasta una pureza de al menos el 95 % para su posterior examen exhaustivo (FIG. 5). En primer lugar, se centrifugó un caldo de cultivo para separar una paleta de células y un medio, y se concentró el DIG 0001 del medio separado a través de una membrana de UF (Millipore, EE.UU.) que tenía un corte de peso molecular de 10.000 Da o inferior. Se purificó el medio filtrado a través de la membrana d UF principalmente usando cromatografía de afinidad de proteína A. Este procedimiento se describe resumidamente de la siguiente manera. Se puso el medio filtrado a través de la membrana de UF en una columna de proteína A que contenía NaCl 0,1 M estabilizada con fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0), y se lavó una proteína sin unir con el mismo tampón. A continuación, se lavó de nuevo una proteína de unión inespecífica con una resina de proteína A con una solución de tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0) que contenía NaCl 0,5 M. Se eluyó una proteína que se unió específicamente a la proteína A con un tampón de glicina-Cl 0,1 M (pH 3,5) que contenía NaCl 0,1 M, y se neutralizó una muestra con una solución de Tris 1 M a pH 6,0. Para evitar la contaminación del ADN, endotoxina y proteína A que puede quedar en la muestra fraccionada a través de la columna de afinidad, se realizó una cromatografía de intercambio catiónico de la siguiente manera. En primer lugar, se mezcló una muestra eluida de una columna de proteína A con el mismo volumen de un tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0). Tras ello, se estabilizó la columna de SP-Sefarosa (5 ml, GE Healthcare) con tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 50 mM, y se añadió una muestra, y se retiraron mediante lavado el ADN y la endotoxina sin unir. Se eluyeron las moléculas de anticuerpo que se unieron a una resina usando un valor de pH y un gradiente de sal (fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), NaCl 1 M). Por último, para eliminar un anticuerpo multimérico, se dispuso la muestra en una columna Superdex 200 (16 mm x 60 cm, GE Healthcare) estabilizada con PBS, y se sometió a cromatografía de exclusión de tamaño. Dicho anticuerpo sometido al procedimiento de purificación se usó para realizar un análisis celular e *in vivo*.

#### 40 Ejemplo 4: Ensayo competitivo de DIG 0001

Se realizó un ensayo competitivo usando ELISA para determinar el anticuerpo de dirección doble DIG 0001 competía o no con VEGF y Ang2 frente a VEGFR-2 y Tie-2. Para ello, se dividió cada uno de VEGF165 y Ang2-RBD a una concentración de 200 ng en una placa de 96 pocillos, y se recubrió la placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante un día. A continuación, se realizó una reacción a 37 °C durante 2 horas usando leche desnatada al 2 %/PBS. Una vez completada la reacción, se lavó la placa de 96 pocillos con PBS, y el grupo de mezcla A (obtenido mediante la mezcla de varias concentraciones (0 a 250 nM) de DIG 0001 con VEGFR-2 (ECD1-3) en el que se cortan 100 ng de Fc), que se había hecho reaccionar previamente a temperatura ambiente durante 1 hora, se introdujo en cada pocillo recubierto con VEGF165, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces, un grupo de mezcla B (obtenido mediante la mezcla de varias concentraciones (0 a 250 nM) de DIG 0001 con 500 ng de Tie-2-Fc), que se había hecho reaccionar previamente a temperatura ambiente durante 1 hora, se puso en cada pocillo, que se recubrió con Ang2-RBD de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez completada la reacción de 2 horas, se lavó la placa de 96 pocillos con PBS, se añadieron 5  $\mu$ g/ml de un anticuerpo de ratón anti-VEGFR-2 (Reliatech, Alemania) como anticuerpo primario de reacción a cada pocillo recubierto con VEGF165, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. Tras lavarse cada pocillo recubierto con Ang2-RBD con PBS, se añadieron 5  $\mu$ g/ml de un anticuerpo de ratón anti-Tie-2 (Abcam, Inglaterra) como anticuerpo primario a cada pocillo, y se hicieron reaccionar a 37 °C durante 1 hora de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Tras ello, se diluyó un anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (Abcam, Inglaterra) en una proporción de 1:5000, se añadió como anticuerpo secundario a los dos pocillos recubiertos con VEGF165 y Ang2-RBD, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se usó un reactivo de sustrato de TMB (BD Biosciences n.º 555214, EE.UU.) para inducir una reacción cromogénica, y se añadieron 50  $\mu$ l de una solución de ácido sulfúrico 2 N ( $H_2SO_4$ ) para detener la reacción cromogénica. La medición de la reacción cromogénica se realizó a una absorbancia de 450 nm y 650 nm usando un lector de microplacas (Tecan, Suiza) (FIG. 6).

Ejemplo 5: Ensayo de supervivencia de HUVEC tras el tratamiento con DIG 0001

Para comprobar un cambio en la viabilidad de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) tras el tratamiento con DIG 0001, se realizó un ensayo de supervivencia celular. La incubación de HUVEC se realizó en un medio M199 exento de rojo de fenol (Invitrogen, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal al 20 % (Hyclone, EE.UU.), 100 unidades/ml de penicilina (Hyclone, EE.UU.), 100 µg/ml de estreptomycin (Hyclone, EE.UU.), 3 ng/ml de un factor de crecimiento de fibroblastos (Upstate Biotechnology, EE.UU.) y 5 unidades/ml de heparina (Sigma-Aldrich, EE.UU.), y el cultivo de células se realizó en una incubadora a 37 °C en condiciones de aire mezclado con CO<sub>2</sub> al 5 % con humedad. Para el ensayo de supervivencia de las células endoteliales vasculares, se pusieron estas células en una placa de 24 pocillos y se incubaron durante 24 hasta que se alcanzó una densidad celular de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. A continuación, se lavó la placa de 24 pocillos dos veces con un medio M199, y se incubaron las células durante 6 horas en condiciones de baja concentración de suero en un medio M199 suplementado con suero bovino fetal al 1 % (Hyclone, EE.UU.). Se trataron previamente las células con diferentes concentraciones de un anticuerpo durante 30 minutos, y a continuación se trataron con 10 ng/ml de VEGF (R & D Systems, EE.UU.) y 100 ng/ml de Ang1 (R & D Systems, USA). Después de la incubación de 48 horas, se trataron las células con WST-8 (Dojindo, Japón) durante 2 horas, y se midió una absorbancia del cultivo celular a una longitud de onda de 450 nm. Entonces, se compararon las viabilidades de las células obtenidas en cada condición (Fig. 7).

Ejemplo 6: Ensayo de migración de HUVEC tras el tratamiento con DIG 0001

Para comprobar la inhibición de la movilidad (quimiotaxis) de HUVEC en DIG 0001, se realizó un ensayo de migración celular. Para el ensayo de migración de HUVEC, se usó un sistema Transwell con filtro de policarbonato de tamaño de poro de 8 µm (Corning, EE.UU.). Antes de su uso, se recubrió la superficie inferior de un filtro con 10 µg de gelatina y se secó. Se añadieron 10 ng/ml de VEGF y 100 ng/ml de Ang1 a los pocillos inferiores incluyendo un medio M199 suplementado con suero bovino fetal al 1 %. Las células endoteliales vasculares, que se incubaron a una concentración baja de suero durante 6 horas, se separaron mediante tratamiento con tripsina, y se suspendieron en un medio M199 suplementado con suero bovino fetal al 1 % hasta que se alcanzó una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células endoteliales vasculares, que se habían tratado previamente con diversas concentraciones de un anticuerpo durante 30 minutos, se pulverizaron uniformemente a una concentración de 100 µl en un sistema Transwell superior, y se incubaron a 37 °C durante 3,5 horas en una incubadora de células. Se tiñeron las células cultivadas con hematoxilina-eosina (Sigma, EE.UU.) o violeta cristal (Sigma, EE.UU.), se retiraron las células no migradas unidas a la superficie superior de un filtro con un hisopo, y se dejaron las células migradas unidas a la superficie inferior del filtro. Se tomaron fotografías de las células con 100 aumentos con un microscopio óptico (Olympus, IX71, Japón) dotado de una cámara digital para comparar el recuento de las células migradas, y se calcularon y analizaron 10 imágenes obtenidas en cada condición (Fig. 8).

Ejemplo 7: Análisis de la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 y Tie-2 en células usando inmunoprecipitación y transferencia Western

Para comprobar la inhibición de la fosforilación de VEGFR-2 y Tie-2 por el anticuerpo de dirección doble DIG 0001, se realizaron una inmunoprecipitación y transferencia de Western. Se incubaron durante 6 horas células endoteliales vasculares que se habían cultivado durante 24 horas en un medio M199 suplementado con suero bovino fetal al 1 %, y luego se trataron previamente con 26,7 µg/ml de anticuerpo DIG 0001 durante 30 minutos. Tras ello, se trataron las células endoteliales vasculares con 10 ng/ml de VEGF y 100 ng/ml de Ang1 durante 15 minutos. Para el análisis usando inmunoprecipitación, se lavaron las células endoteliales vasculares con PBS frío, y se trataron con 500 µl de una solución de tampón para la inmunoprecipitación (Triton X-100 al 1 %, Nonidet P-40 al 0,5 %, Tris/HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y fluoruro de sodio 1 mM). Se hizo pasar un soluto recogido con un raspador a través de un inyector de calibre 26 varias veces, se disolvió lo suficiente y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g para recuperar un sobrenadante. Se añadieron 2 µg de anticuerpo de inmunoprecipitación anti-Tie-2 (R & D Systems, EE.UU.) a 300 µg de soluto, y se hicieron reaccionar durante 8 horas. A continuación, se añadió una proteína A/G más de agarosa (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), y se unió al anticuerpo de inmunoprecipitación. Se centrifugó el complejo inmunitario resultante unido a la proteína A/G más agarosa, y se lavó repetidamente 3 a 5 veces con una solución tampón. Después, se añadió un tampón de muestra de SDS, se hirvió y después se centrifugó para eliminar un precipitado de agarosa.

Para el análisis usando la transferencia Western, se trataron las células endoteliales vasculares con una solución de tampón de lisis (SDS al 1 % (p/v), Tris 10 mM (pH 7,4), ortovanadato de sodio 2 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y fluoruro de sodio 1 mM), obteniéndose un soluto, y se llevó el soluto a ebullición y se centrifugó a 4 °C a 10.000 g durante 5 minutos para eliminar un precipitado insoluble. Se mezcló un sobrenadante con un tampón de muestra de SDS, y se hirvió durante 10 minutos. La SDS-PAGE y la transferencia Western se realizaron de acuerdo con métodos ampliamente usados en la técnica, y las muestras usadas fueron las siguientes: Gel de SDS-poliacrilamida al 12 %, una membrana de PVDF (Millipore n.º IPVH00010, EE.UU.), un anticuerpo anti-Tie-2 (Abcam, Inglaterra) y un anticuerpo anti-fosfotirosina (Upstate Biotechnology, EE.UU.), usados como anticuerpos primarios para el análisis de las actividades de inhibición de la fosforilación de Tie-2; un anticuerpo

anti-p44/42 (Cell Signaling technology, EE.UU.) y un anticuerpo anti-fosfo p44/42 (Cell Signaling technology, EE.UU.); un anticuerpo anti-AKT (Cell Signaling technology, EE.UU.) y un anticuerpo anti-AKT fosforilada (Cell Signaling technology, EE.UU.); un anticuerpo anti-VEGFR-2 (Cell Signaling technology, EE.UU.) y un anticuerpo anti-VEGFR-2 fosforilado (Cell Signaling technology, EE.UU.), usados como anticuerpos primarios para el análisis de las actividades de inhibición de la fosforilación de VEGFR-2; un anticuerpo anti-AKT (Cell Signaling technology, EE.UU.) y un anticuerpo anti-AKT fosforilada (Cell Signaling Technology, EE.UU.); y un anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), usados como anticuerpos secundarios que se unen a un anticuerpo primario para la quimioluminiscencia (Fig. 9).

**Ejemplo 8:** Inhibición del crecimiento tumoral por DIG-0001 en un modelo animal de glioblastoma

Para el crecimiento del glioblastoma ortotópico, se usaron ratones Balb/c-nu macho (Japón SLC) exentos de un patógeno específico. El trasplante intracerebral de glioblastoma U-87MG (2 x 10<sup>5</sup> células, American Type Culture Collection) se realizó de acuerdo con métodos conocidos. El día después del trasplante intracerebral del glioblastoma, se dividieron los ratones en dos grupos (n = 4), y se trataron de la siguiente manera: (a) inyección intraperitoneal de PBS y (b) inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de DIG-0001. Todos los tratamientos se realizaron 5 veces (días 15, 18, 21, 24 y 27 después de la inoculación de las células neoplásicas). El Día 29 después del trasplante de las células neoplásicas, se sacrificaron los ratones, se les extirpó el cerebro y les seccionó coronalmente. Se fijó un fragmento con formalina tamponada al 10 % y se introdujo en formalina, introduciéndose el resto en un compuesto de OCT. Se obtuvo el volumen del tumor midiendo el volumen de un fragmento que tenía la región tumoral más alta, y se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: Anchura<sup>2</sup> x Longitud x 0,5 (FIG. 10).

**Aplicabilidad industrial**

La composición de acuerdo con la presente invención se puede usar para tratar enfermedades relacionadas con la angiogénesis, en particular, el cáncer.

Aunque se han ilustrado y descrito las realizaciones preferidas de la presente invención, los expertos habituales en la materia entenderán que se pueden realizar cambios y otras modificaciones sin apartarse de la invención en sus aspectos más amplios. En las siguientes reivindicaciones, se exponen diversas características de la presente invención.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> PharmAbcine Inc.
- <120> Anticuerpo biespecífico que tiene una forma nueva y uso del mismo
- <150> KR10-2009-0044032
- <151> 20-05-2009
- <160> 6
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 45
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebador
- <400> 1  
cactccagcg ggtggtgggtc cttcagagac tgtgctgaag tattc 45
- <210> 2
- <211> 47
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebador
- <400> 2

ES 2 605 604 T3

actacctccg cctcctgaga aatctgctgg tcggatcatc atggttg 47

5 <210> 3  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 3

ggagcctcct ccgccactac ctccgcctcc tgagaaatct gctggtcgga tcatcatggt 60

tg 62

15 <210>4  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 4

25 agtggcggag gaggctccgg ttccaatttt atgctgactc ag 42

30 <210>5  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

35 <400> 5  
 cagatctttc cagaggctg gctcctc 27

40 <210>6  
 <211> 1047  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> mAng2-TTAC0001 lgt

45 <400> 6



# ES 2 605 604 T3

ccagcgggtgt gggttccttc agagactgtg ctgaagtatt caaatcagga cacaccacga	60
atggcatcta cacgtaaca ttcctaatt ctacagaaga gatcaaggcc tactgtgaca	120
tggaagctgg aggaggcggg tggacaatta ttcagcgacg tgaggatggc agcgttgatt	180
ttcagaggac ttgaaagaa tataaagtgg gatttggtaa cccttcagga gaatattggc	240
tgggaaatga gtttgtttcg caactgacta atcagcaacg ctatgtgctt aaaatacacc	300
ttaaagactg ggaagggaat gaggcttact cattgtatga acatttctat ctctcaagtg	360
aagaactcaa ttataggatt caccttaaag gacttacagg gacagccggc aaaataagca	420
gcatcagcca accaggaat gattttagca caaaggatgg agacaacgac aaatgtatct	480
gcaaatgttc acaaatgcta acaggaggct ggtggtttga tgcattgtgg ccttccaact	540
tgaacggaat gtactatcca cagaggcaga acacaaataa gttcaacggc attaaatggt	600
actactggaa aggctcaggc tattcgctca aggccacaac catgatgatc cgaccagcag	660
atttctcagg aggcggagggt agtggcggag gaggctccgg ttccaatttt atgctgactc	720
agccccctc agtgtcagtg tccccaggaa agacggccag gatcacttgt aggggagata	780
accttggaga tgtaaatggt cactggtacc agcagcggcc aggccaggcc cctgtattgg	840
tcatgtatta tgatgccgac cggccctcag ggatccctga gcgattctct ggctccaact	900
ctgggaacac ggccacactg accatcagcg gagtogaagc cggggatgag gccgactact	960
attgtcaggt gtgggatagg actagtgagt atgtcttcgg aactgggacc aaggtcaccg	1020
tcctaggtgg aggagccagc ctcgtgg	1047

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un scFv de dirección doble que comprende un dominio de unión a Tie-2 de angiopoyetina (Ang2) fusionado a través de un enlazador a la región N-terminal de la cadena ligera de un scFv dirigido contra el VEGFR2, estando dicho anticuerpo scFv de dirección doble codificado por una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6.
2. Un ADN que codifica el anticuerpo de dirección doble de la reivindicación 1 como se expone en SEQ ID NO: 6.
- 10 3. Un vector de expresión recombinante que contiene el ADN de la reivindicación 2.
4. Una célula huésped transformada con el vector de expresión recombinante de la reivindicación 3.
- 15 5. Un método de producción de un anticuerpo o scFv de dirección doble de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:  
- incubar la célula huésped de la reivindicación 4; y  
- aislar el anticuerpo o scFv de dirección doble de una solución de cultivo de la célula huésped.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo o scFv de dirección doble se purifica además usando cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con una columna de afinidad de proteína A, una columna de SP-sefarosa y una cromatografía de exclusión por tamaño.
7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o scFv de dirección doble de la reivindicación 1.
- 25 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad relacionada con la angiogénesis.
- 30 9. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la enfermedad relacionada con la angiogénesis se selecciona del grupo que consiste en cáncer, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, retinopatía diabética, soriasis e inflamación crónica.
- 35 10. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de riñón, melanoma, cáncer metastásico de hueso de un cáncer de próstata, cáncer de ovario y leucemia.

FIG1



FIG.2

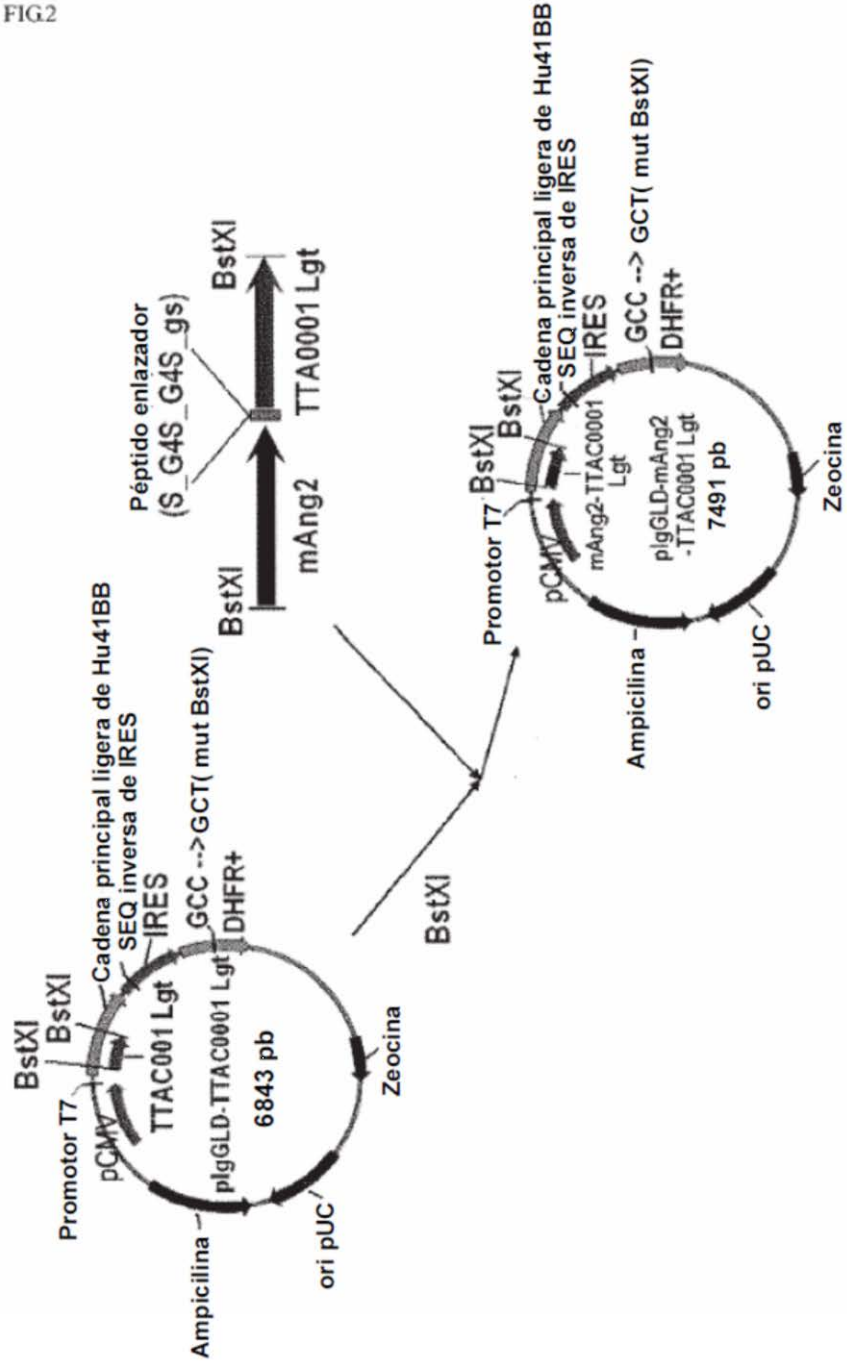


FIG3

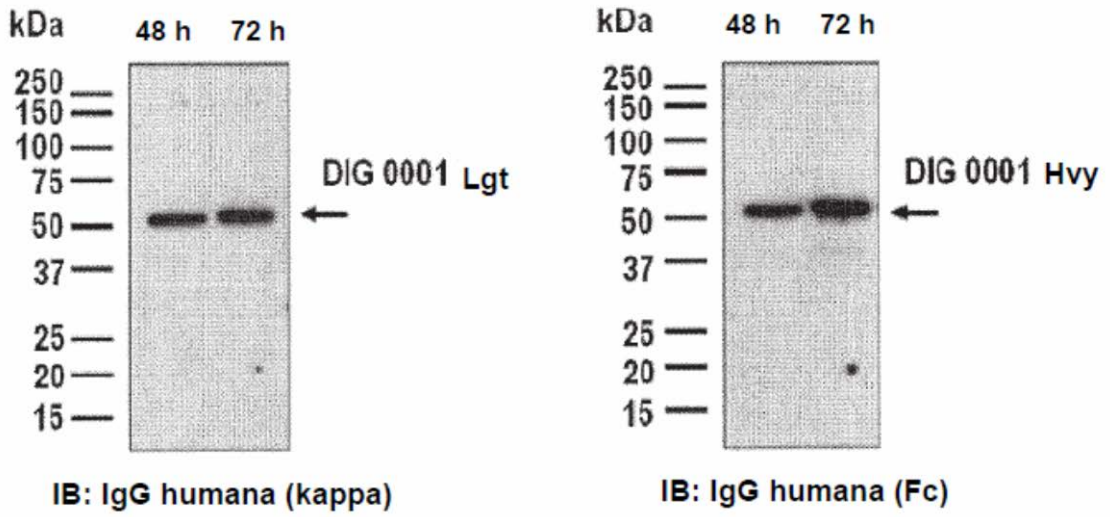


FIG4

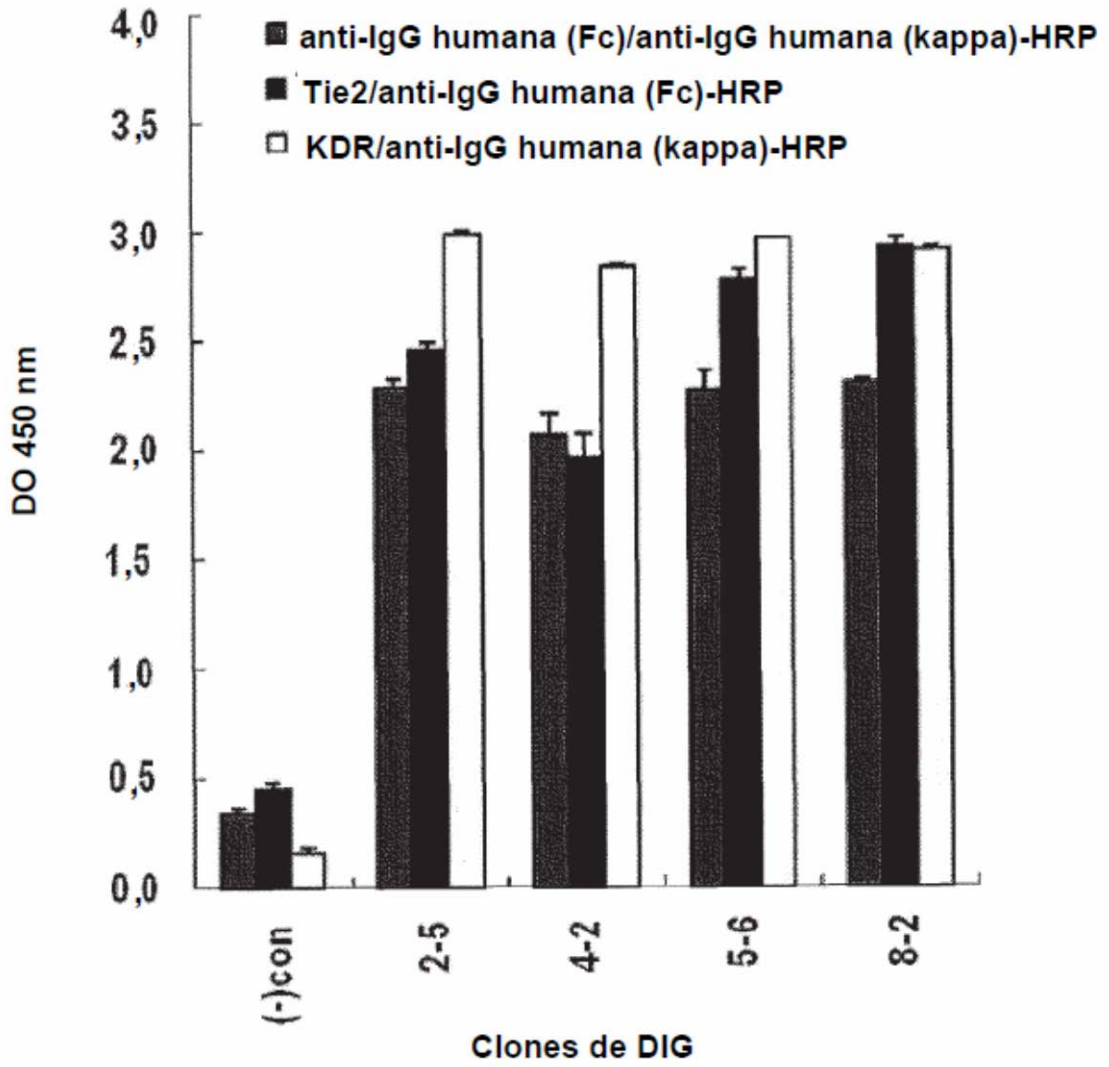


FIG.5

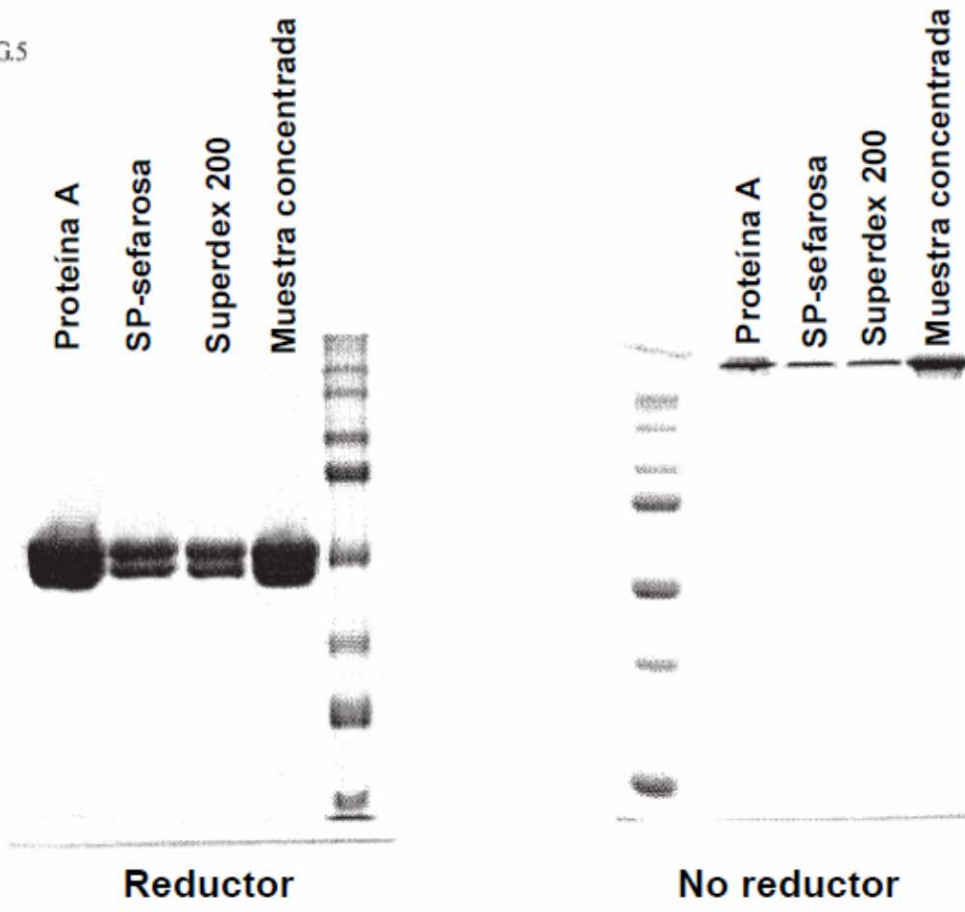
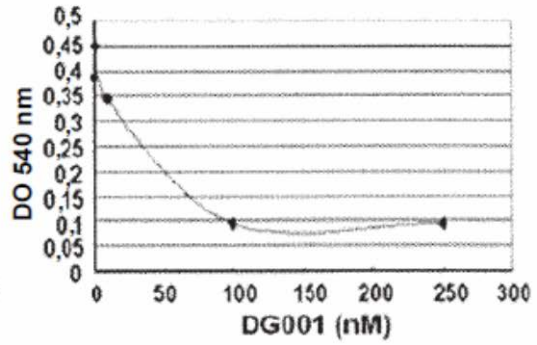
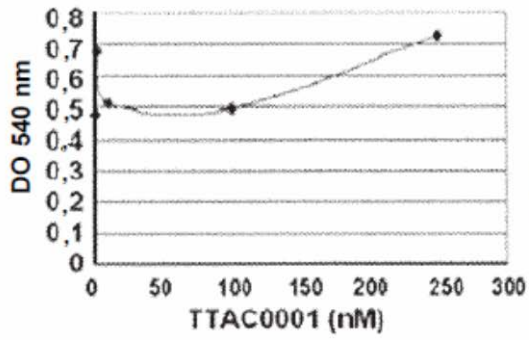


FIG.6

1) Recubrimiento de VEGF 165



2) Recubrimiento de Ang2-Fc

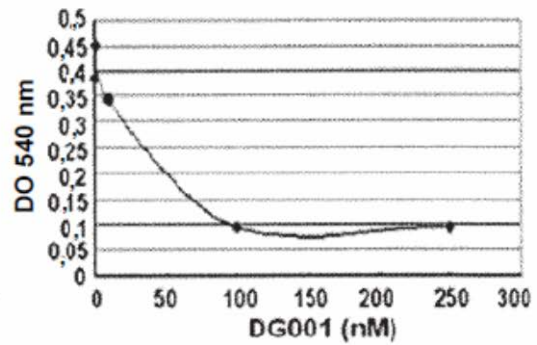
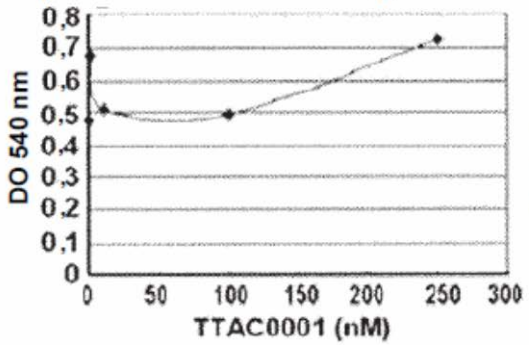




FIG.7

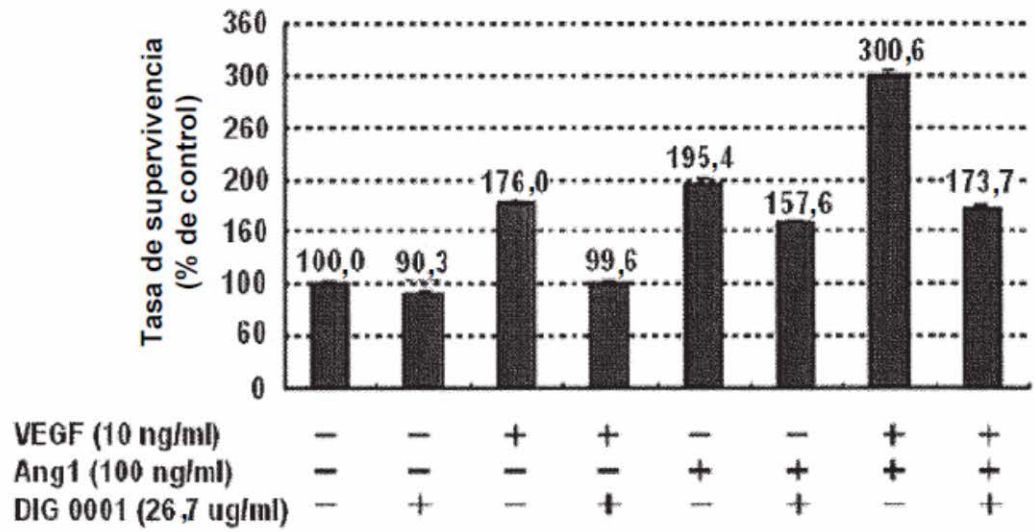


FIG.8

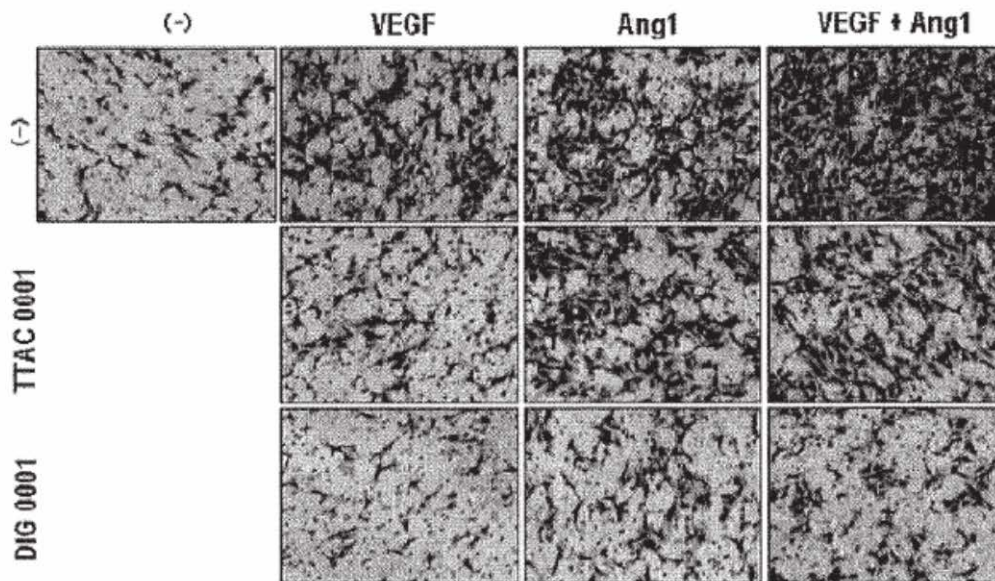
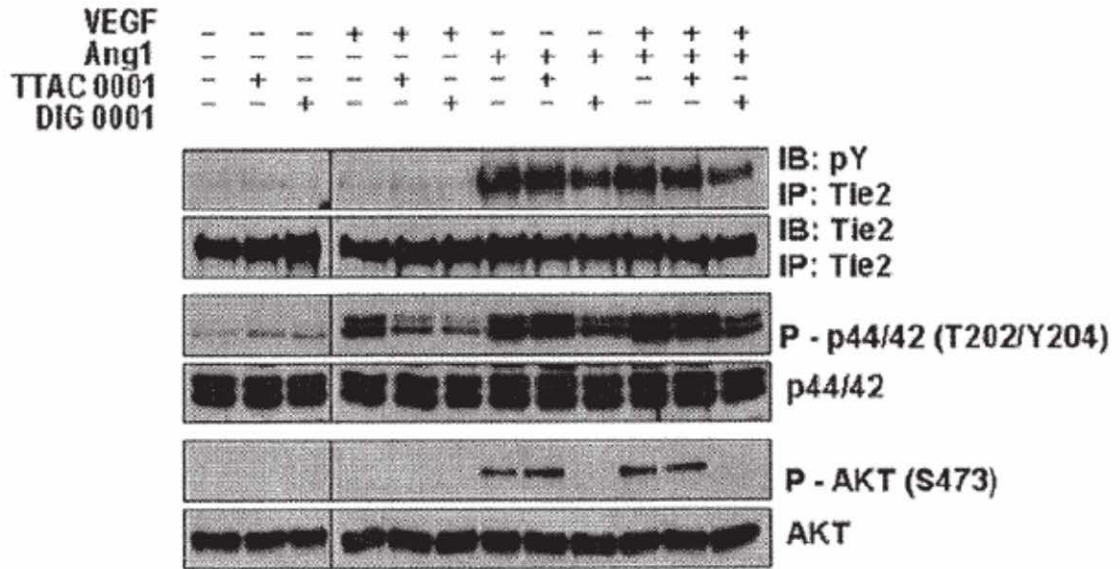


FIG9

**1) ANÁLISIS DE INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE Tie-2**



**2) ANÁLISIS DE INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE KDR**

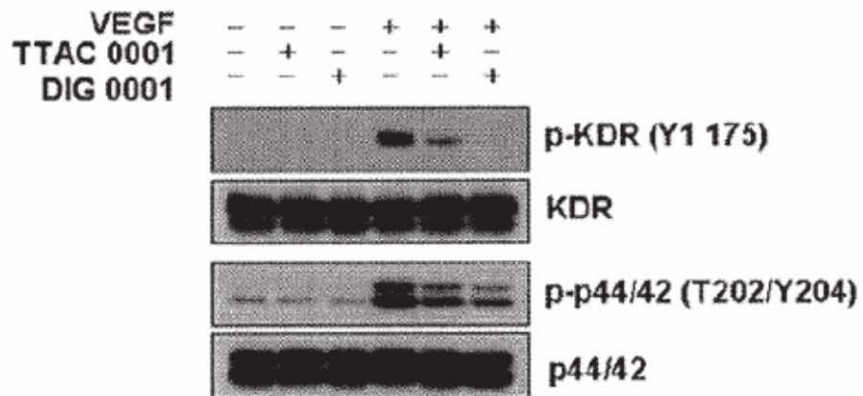


FIG.10

