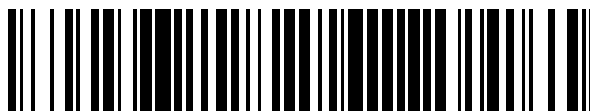


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 267**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2013 PCT/KR2013/010589**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14081202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2013 E 13857338 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2924052**

54 Título: **Anticuerpo de doble diana que se dirige a VEGFR-2 y DLL4, y composición farmacéutica que comprende el mismo**

30 Prioridad:

21.11.2012 KR 20120132431

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

24.02.2020

73 Titular/es:

**PHARMABCINE INC. (100.0%)
 412, Daejeon Bio Venture Town, 1662, Yuseong-
 daero, Yuseong-gu
 Daejeon 305-811, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, JOONG KYU;
 YOO, JIN SAN;
 LEE, SANG HOON;
 LEE, WEON SUP;
 KIM, SUNG WOO;
 SHIM, SANG RYEOL;
 YOO, JIN SANG;
 LEE, YOUNG AE;
 PARK, MI JU;
 BYUN, SANG SOON;
 LEE, HYUK JOON;
 KIM, DO YUN;
 KIM, YEUN JU;
 CHOI, JIN HEE;
 NAHM, KYUNG HEE;
 NAM, JU RYUNG;
 JEONG, JONG GEUN;
 JEONG, BO YOUNG;
 LEE, EUN JIN;
 LEE, SEON YOUNG;
 PARK, IN SOOK;
 LEE, JIN SOOK;**

ES 2 744 267 T3

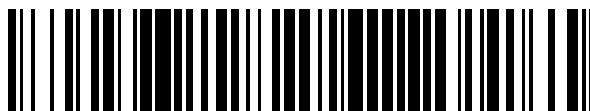
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 267**

72 Inventor/es:

YOON, JAE BONG;
KIM, NAM YE y
OH, SEON HWAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 744 267 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 doble diana que se dirige a VEGFR-2 y DLL4, y composición farmacéutica que comprende el mismo

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a una forma novedosa de un anticuerpo de doble diana en el que un antagonista de DLL4 está unido a un terminal de un anticuerpo que se dirige a VEGFR-2 para marcar además DLL4 humana, ADN que codifica el anticuerpo, un vector de expresión recombinante que incluye el mismo, células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, un procedimiento de producción del anticuerpo de doble diana usando las células hospedadoras, una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de doble diana, y un procedimiento de medición de la eficacia antagonista de DLL4 del anticuerpo de doble diana.

10 **[Técnica anterior]**

La angiogénesis es un mecanismo en el que se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos existentes por crecimiento, división, migración, y similares, de una célula endotelial, juega un papel importante en los procesos del crecimiento normal incluyendo la curación de herida o el ciclo menstrual femenino (Risau, *Nature*, 386 671, 1997), y además, se sabe que la angiogénesis anormalmente excesiva juega un papel crucial en enfermedades 15 tales como el crecimiento tumoral y la metástasis, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), retinopatía diabética, psoriasis, artritis reumatoide e inflamación crónica (Carmeliet and Jain, *Nature*, 407:249, 2000).

La hipótesis de que el crecimiento tumoral y la metástasis son dependientes de angiogénesis, y por lo tanto, una terapia que se centra en la anti-angiogénesis podría ser un nuevo agente terapéutico para los tumores sólidos fue planteada por el Dr. J. Folkman en 1971. Después de eso, la investigación de una tecnología relacionada con la 20 inhibición de los mecanismos de angiogénesis excesiva ha atraído la atención a muchos investigadores (Ferrara and Kerbel, *Nature*, 438:967, 2005). Un aspecto progresivo de la angiogénesis se determina por equilibrio completo de los inductores de la angiogénesis y los inhibidores de la angiogénesis, y se desarrolla por procedimientos secuenciales complejos y de multietapa. Con detalle, diversos inductores de la angiogénesis que incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) secretado por tejidos tumorales o dañados se unen a correspondientes receptores de 25 células endoteliales vasculares periféricas existentes para activar las células endoteliales vasculares activas, que incrementa la permeabilidad de las células endoteliales vasculares, y para secretar proteasa tal como metaloproteínasa de matriz (MMP), la cual descompone la membrana basal y la matriz extracelular que rodea las células endoteliales, de modo que las células endoteliales vasculares escapan de los capilares existentes y migran/proliferan hacia el tejido que secreta el inductor de la angiogénesis. Las células endoteliales vasculares 30 migradas y proliferadas forman una estructura tubular intravascular, y por último, los pircitos que son un soporte estructural de la célula endotelial vascular se introducen para conseguir la formación de vaso sanguíneo estable y maduro.

Como se ha descrito anteriormente, se encontró que la señalización de VEGF y un receptor de VEGF (VEGFR) unido al VEGF se suprime para inhibir finalmente la angiogénesis, obteniendo de ese modo efectos terapéuticos sobre 35 diversas enfermedades de degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, psoriasis, artritis reumatoide e inflamación crónica, incluyendo crecimiento y metástasis de tumor, y por tanto, ha estado en curso el desarrollo de diversos fármacos capaces de inhibir la actividad de VEGF.

Específicamente, Separación y purificación de proteína de formas de VEGF y clonación de ADNc por el grupo del Dr. N. Ferrara de Genentech en 1989 (Leung y col., *Science*, 246:1.306, 1989). Hasta ahora se sabe que VEGF que también es referido como VEGF-A tiene cuatro isotipos (VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF206), y se informa que entre los cuatro isotipos, VEGF165 es el más abundante en todos los tejidos humanos excepto para la placenta (Tisher y col., *J. Biol. Chem.*, 266:11.947, 1991). Se sabe que VEGF se une a receptores VEGFR-1 y VEGFR-2/KDR con afinidad significativamente alta; sin embargo, la señal de VEGF se transfiere principalmente a través de VEGFR- 2 para inducir los mecanismos relacionados con la angiogénesis tales como proliferación, migración, y similares, de 45 células endoteliales vasculares. Debido a las razones anteriormente descritas, VEGF y VEGFR-2 llegan a ser dianas principales para inhibir el mecanismo de la angiogénesis inducido por VEGF y un número de estos tratan con VEGF y VEGFR-2 (Ellis and Hicklin, *Nature Rev. Cancer*, 8:579, 2008; Youssoufian y col., *Clin. Cancer Res.*, 13:5544s, 2007).

Por ejemplo, Avastin (bevacizumab, Genentech) es un anticuerpo humanizado que se dirige a VEGF-A (Ferrara y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 333:328, 2005), el cual ha recibido la aprobación de la FDA de EE.UU. para 50 tratamiento para cáncer colorrectal metastásico en 2004, cáncer de pulmón de células no pequeñas en 2006 y cáncer de mama metastásico Her-2 negativo en 2008, respectivamente, y se aprueba para tratar glioblastoma multiforme (GBM), y cáncer renal. En la actualidad, los ensayos clínicos sobre una diversidad de tumores sólidos están en curso para ampliar las indicaciones. Además, Lucentis que se desarrolló en la misma compañía, es un anticuerpo preparado para cortar fragmentos Fab solamente de Avastin para la buena permeabilidad de Lucentis cuando se inyecta Lucentis 55 en la retina para inhibir la angiogénesis excesiva alrededor de la mácula que es un aspecto importante de la degeneración macular senil (Eter y col., *Biodrgus*, 20:167, 2006), y como agente terapéutico para la degeneración macular húmeda relacionada con la edad (húmeda-DMRE), el cual ha recibido la aprobación de la FDA de EE.UU. en 2006.

Como otro anticuerpo para el tratamiento que se dirige a VEGF, existe la VEGF-trap fabricado por Regeneron (Holash y col., *PNAS*, 99:11.393, 2002). VEGF-trap es un receptor señuelo soluble en una forma en la que el segundo dominio tipo inmunoglobulina de VEGFR-1 y el tercer dominio tipo inmunoglobulina de VEGFR-2 se fusionan a Fc humano, el cual aún no ha recibido la aprobación de la FDA de EE.UU., pero ha estado en curso en la fase del estadio III para cáncer de mama metastásico, cáncer de pulmón metastásico, cáncer colorrectal metastásico, cáncer de próstata refractario de hormona, y similares.

Mientras tanto, ejemplos de anticuerpos anti-angiogénesis que se dirigen a VEGFR-2 que es un receptor de VEGF incluyen IMC-1121B (documento EP 1916001A2) fabricado por Imclone company, CDP-791 (documento PCT/GB02/04619) fabricado por UCB company, Tanibirumab (TTAC-0001) (documento WO2008/153237) desarrollado por los presentes inventores y ha estado en un ensayo clínico, y similares.

IMC-1121B es un anticuerpo monoclonal seleccionado de una genoteca de Fab completamente humana, el cual ha estado en curso en la fase del estadio III para cáncer de mama metastásico, y se introdujo en la fase del estadio III para cáncer de estómago en 2010. CDP-791 fabricado por UCB es un anticuerpo humanizado, el cual ha estado en curso en la fase del estadio II para cáncer de pulmón de células no pequeñas en forma de Di-Fab PEGilado. Puesto que este anticuerpo no tiene Fc, no se puede esperar citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo o citotoxicidad dependiente de complemento.

Por último, Tanibirumab (TTAC-0001) desarrollada por los presentes inventores es un anticuerpo monoclonal seleccionado de una genoteca de ScFv completamente humana, y es el único anticuerpo que tiene reactividad con flk-1 de ratón y origen de rata (homólogo de VEGFR-2) mientras simultáneamente se dirige a VEGFR-2, lo cual es una de las características distinguibles importantes de IMC-1121B fabricado por Imclone (documento WO2008/153237). En particular, la reactividad cruzada de especies cruzadas mostrada por Tanibirumab es posible para realizar una investigación del modelo de enfermedad animal para llevar a cabo el desarrollo futuro de agente anti-cáncer para el cáncer específico por fases, lo cual hace más fáciles las investigaciones relacionadas.

Como se ha descrito anteriormente, las investigaciones de VEGF y VEGFR-2 dirigidos se han desarrollado drásticamente durante los últimos cinco años, y un número de agentes terapéuticos son desarrollados por el mercado y los estudios clínicos.

Mientras tanto, las células diferenciadas en célula punta (Tip) por señalización VEGF/VEGFR-2 expresan fuertemente DLL4 y se unen al receptor Notch 1 presente en las células circundantes, y las células en las que la ruta de señalización de Notch1 se activa se diferencian en células tallo (stalk) para formar la estructura tubular del vaso sanguíneo normal, lo cual provoca que la ruta de señalización DLL4/Notch1 sea uno de los mecanismos más importantes para la ruta VEGF/VEGFR-2 y la angiogénesis (Dufraigne y col., *Oncogene*, 27:5.132~5.137, 2008).

Hasta ahora se sabe que DLL4 es uno de los ligandos para un receptor Notch, y hay cuatro tipos de receptores Notch (Notch 1 a 4) y cinco tipos de ligandos de Notch (Jagged-1, Jagged-2, DLL1, DLL3 y DLL4) en mamíferos. La ruta de señalización de Notch se inicia uniendo un ligando de Notch de una célula a un receptor Notch de otra célula, y necesariamente se activa por interacción directa entre las diferentes células (Bray SJ, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7(9):678, 2006).

Cuando el ligando de Notch se une al receptor Notch, en primer lugar se activa una metaloproteasa ADAM para escindir un sitio proximal exterior de la membrana celular del receptor Notch y, a continuación, se activa un complejo gamma-secretasa para escindir un sitio proximal interno de la membrana celular del receptor Notch, de modo que el dominio intracelular de Notch (NICD) se aísla y migra dentro del núcleo. NICD se une a un factor de transcripción RBPJ/CSL para inducir la expresión de los genes diana de Notch tal como proteínas hélice-bucle-hélice básicas incluyendo Hes y Hey. La ruta de señalización de Notch determina la proliferación/diferenciación/apoptosis de acuerdo con la situación de las correspondientes células, y juega un importante papel en el mantenimiento de las células madre normales y las células madre cancerosas.

Básicamente, todos los receptores Notch son capaces de unirse a todos los ligandos de Notch; sin embargo, combinaciones de diversas uniones están selectivamente controladas en microambientes de las correspondientes células. Por ejemplo, DLL4 se expresa fuertemente en células epiteliales durante un procedimiento de desarrollo fetal, y se une a Notch1 y Notch4 que se expresan en las células endoteliales periféricas; sin embargo, la unión DLL4-Notch1 es la más importante de una manera exclusiva (Yan M, *Vasc. Cell*, 2011), y la angiogénesis se desarrolla a través de la unión DLL4-Notch1. La anterior descripción se encuentra bien por el ensayo de deficiencia de gen, y similares (Duarte y col., *Genes Dev*, 2004; Gale y col., *PNAS*, 2004; Krebs y col., *Genes Dev.*, 2004).

Por lo tanto, cuando se suprime la unión DLL4-Notch1, se puede inhibir la angiogénesis, y por lo tanto, diversas enfermedades tales como tumor, y similares, son capaces de ser tratadas. Ya se ha demostrado que cuando VEGF se inhibe usando Avastin (bevacizumab), y similares, en el tratamiento de cáncer, se inhibe la angiogénesis para disminuir la perfusión del tumor, y se disminuye un tamaño del tumor. Mientras tanto, cuando se inhibe la unión con Notch1 expresado en las células periféricas mientras se dirige a DLL4, los vasos sanguíneos se generan de manera anormal y en gran medida (hiperexplosión), pero no alcanzan la función completa, lo cual disminuye la perfusión del tumor no funcional, y como resultado, se reduce el tamaño del tumor (Thurston y col., *Nat. Rev. Cancer*, 7(5):327,

2007).

De forma interesante, cuando un anticuerpo que inhibe VEGF y DLL4 se administra en experimentos animales de xenoinjerto usando varias líneas de célula cancerosa realizados en el equipo de investigación de Genentech, el crecimiento del cáncer se suprime mucho más fuertemente, en comparación con un caso en el que un anticuerpo que inhibe VEGF y un anticuerpo que inhibe DLL4 se administran por separado, respectivamente (Ridgway y col., *Nature*, 444(7.122):1.083, 2006). Se sugiere que la señalización por la ruta DLL4/Notch1 no se activa simplemente por la ruta VEGF/VEGFR-2, y diversas enfermedades relacionadas con la angiogénesis tales como tumor, y similares, son capaces de ser tratadas eficazmente inhibiendo simultáneamente las señalizaciones por dos rutas.

Además, se encontró que la inhibición de DLL4 tiene un efecto sobre tanto un tumor que es sensible al inhibidor de la ruta VEGF/VEGFR-2 como un tumor que es resistente al inhibidor de la ruta VEGF/VEGFR-2 (Ridgway y col., *Nature*, 444(7.122):1.083, 2006; Noguera-Troise y col., *Nature*, 444(7.122):1.032, 2006), lo cual proporciona una pista significativamente importante para superar la resistencia que se da en la actualidad y frecuentemente cuando se administran fármacos tales como Avastin que bloquea VEGF (incluyendo dos casos de una resistencia intrínseca en la que Avastin no es eficaz desde el comienzo y resistencia adquirida en la que una eficacia de Avastin está cayendo gradualmente con el tiempo).

Además, se encontró por el equipo de investigación de Oncomed que la inhibición de DLL4 reduce directamente la frecuencia de las células madre cancerosas en tumor e inhibe el crecimiento del tumor (Hoey y col., *Cell Stem Cell*, 2009), lo cual sugiere que es posible la inhibición de DLL4 para bloquear esencialmente la recurrencia del cáncer. Por último, la resistencia a quimioterapia anticáncer y agentes terapéuticos de anticuerpo tales como Herceptin, y similares, que se usan en la actualidad para el tratamiento de cáncer tiene mucha relevancia para la ruta de señalización de Notch y la inhibición de la ruta DLL4/Notch1 también es posible para superar la resistencia de la quimioterapia anticáncer y los agentes terapéuticos de anticuerpo tales como Herceptin, y similares (Wang y col., *Biochim Biophys Acta*, 1.806(2):258, 2010).

El documento US 2010/0260668A1 desvela inmunoglobulinas de dominio variable doble y sus usos. En particular, el documento describe proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas modificadas por ingeniería, procedimientos de producción, y específicamente usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades.

Como se ha descrito anteriormente, diversas enfermedades relacionadas con la angiogénesis tales como tumor, y similares, son capaces de ser tratadas eficazmente inhibiendo simultáneamente señales por dos rutas VEGF/VEGFR-2 y DLL4/Notch 1. Sin embargo, aún no se ha producido el desarrollo de fármacos que son eficaces para esto, y por lo tanto, se requiere urgentemente el desarrollo pertinente.

[Resumen de la invención]

Los presentes inventores llevaron a cabo una investigación del desarrollo de un agente terapéutico capaz de tratar diversas enfermedades relacionadas con la angiogénesis tales como tumor, y similares, mediante la señalización supresora más eficazmente y simultáneamente de dos rutas, VEGF/VEGFR-2 y DLL4/Notch1 para resolver los problemas anteriormente descritos, y como resultado, se encontró que un anticuerpo de doble diana que se dirige simultáneamente a VEGFR-2 y DLL4 que comprende un antagonista de DLL4, el cual está unido a un terminal de un anticuerpo que se une a VEGFR-2, en el que el anticuerpo que se une a VEGFR-2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 a 6, en el que el antagonista de DLL4 es el 11° y 12° dominio tipo EGF de unión a calcio de Notch1 humano, y en el que el antagonista de DLL4 está unido al N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a VEGFR-2, muestra eficazmente un efecto de tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con la angiogénesis, y se completa la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar ADN que codifica el anticuerpo de doble diana, y un vector de expresión recombinante que incluye el mismo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y un procedimiento de producción del anticuerpo de doble diana según la presente invención, usando las células hospedadoras.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar enfermedades relacionadas con la angiogénesis que comprende el anticuerpo de doble diana, en la que las enfermedades relacionadas con la angiogénesis es una o más seleccionadas del grupo que consiste en crecimiento tumoral, metástasis tumoral, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), retinopatía diabética, psoriasis, artritis reumatoide e inflamación crónica.

Descripción de los dibujos

FIG. 1 representa la secuencia de aminoácidos de los dominios 11 y 12 tipo EGF de Notch1 unidos a DLL4. FIG. 2 es un diagrama de un vector PMC-201 v213 según la presente invención.

FIG. 3 representa los resultados obtenidos expresando aleatoriamente el vector según la presente invención usando una célula 293-T y confirmando la producción de un anticuerpo de doble diana purificado a través de SDS-PAGE.

FIG. 4 representa los resultados del análisis ELISA de la afinidad de unión a VEGFR-2 y DLL4 humana, del anticuerpo de doble diana según la presente invención.

FIG. 5 representa los resultados del análisis Biacore de la afinidad de unión a DLL4 humana, del anticuerpo de doble diana según la presente invención.

FIG. 6 representa los resultados del análisis de citómetro de flujo de la afinidad de unión a DLL4 humana, del anticuerpo de doble diana según la presente invención.

FIG. 7 representa los resultados del ensayo de proliferación sobre HUVEC, del anticuerpo de doble diana según la presente invención.

FIG. 8 representa los resultados del análisis FACS del fenómeno que el anticuerpo de doble diana según la presente invención suprime de manera competitiva la unión de Notch-Fc a DLL4 humana.

FIG. 9 representa los resultados del ensayo de luminiscencia de la luciferasa del fenómeno que el anticuerpo de doble diana según la presente invención suprime la activación promotor por Notch-1.

FIG. 10 representa los resultados del análisis de transferencia Western del fenómeno que un incremento en el dominio intracelular de Notch (NICD) se suprime mediante la activación de Notch-1, en el momento de cultivar el anticuerpo de doble diana según la presente invención y HUVEC en una placa de cultivo recubierta con hDLL4.

FIG. 11 representa los resultados del análisis de transferencia Western del fenómeno que un incremento en el dominio intracelular de Notch (NICD) se suprime mediante la activación de Notch-1, en el momento de cocultivo del anticuerpo de doble diana según la presente invención y HUVEC en una línea celular 293 que expresa hDLL4.

[Mejor modo]

Siempre que no se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende generalmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. En general, una nomenclatura usada en la presente memoria y los procedimientos experimentales que se describen más adelante son bien conocidos en el presente campo técnico y generalmente se usan.

En una realización para conseguir los objetos de la presente invención, la presente invención proporciona un anticuerpo de doble diana que se dirige simultáneamente a VEGFR-2 y DLL4 comprendiendo un antagonista de DLL4, el cual está unido a un terminal de un anticuerpo que se une a VEGFR-2, en el que el anticuerpo que se une a VEGFR-2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 a 6, en el que el antagonista de DLL4 es el 11° y 12° dominio tipo EGF de unión a calcio de Notch1 humano, y en el que el antagonista de DLL4 está unido al N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de unión a VEGFR-2.

Se confirmó que el anticuerpo de doble diana según la presente invención tiene un efecto de inhibir las enfermedades causadas por angiogénesis, inhibiendo más eficazmente la angiogénesis, y tiene una afinidad de unión a cada una de las dianas VEGFR-2 y DLL4. Además, se confirmó a partir del experimento inhibitor de la proliferación de HUVEC que el anticuerpo de doble diana según la presente invención tiene excelente capacidad inhibitoria de la proliferación de HUVEC en comparación con un anticuerpo sencillo que se dirige a solamente VEGFR-2, por ejemplo, Tanibirumab.

En la invención, un término "anticuerpo de doble diana" significa un anticuerpo que tiene una afinidad de unión o antagonismo a una o más dianas, y significa que un anticuerpo en el que dos anticuerpos que tienen una afinidad de unión o antagonismo a diferentes dianas se unen uno u otro o un anticuerpo que tiene una afinidad de unión a una diana se une a un material que tiene antagonismo a la otra diana.

Además, en la presente invención, un término "anticuerpo" incluye tanto anticuerpo policlonal como anticuerpo monoclonal, en el que se puede usar un fragmento de una molécula de anticuerpo así como una forma completa que incluye dos cadenas ligeras que tienen la longitud completa y dos cadenas pesadas que tienen la longitud completa. El fragmento de la molécula de anticuerpo significa un fragmento que necesariamente posee una función de unión a antígeno e incluye una cadena sencilla, Fv(scFv), Fab, F(ab'), F(ab')₂, un dominio único, y similares.

Preferentemente, el anticuerpo de doble diana según la divulgación tiene una forma en la que un anticuerpo que es específico a un factor de angiogénesis o un receptor para tal factor de angiogénesis se une a un antagonista de angiogénesis, es decir, un antagonista a un factor de angiogénesis o un receptor para tal factor de angiogénesis.

En el anticuerpo de doble diana según la divulgación, el anticuerpo específicamente unido a VEGFR-2 es útil sin limitación siempre y cuando sea un anticuerpo que se une al VEGFR-2 para inhibir la señalización VEGF/VEGFR-2, preferentemente, Tanibirumab o Bevacizumab, o variantes de los mismos, pero la presente invención no se limita a las mismas.

Además, el antagonista de DLL4 es útil sin limitación siempre y cuando sea una sustancia que tenga propiedad de inhibición de la señalización DLL4/Notch1, particularmente, se prefiere un receptor soluble del cual se suprime un dominio celular de Notch1, pero la presente invención no se limita a las mismas. Más preferentemente, como

antagonista de DLL4, se pueden usar particularmente el 11° y el 12° dominio tipo EGF de un receptor Notch1 a DLL4 (en lo sucesivo referido en el presente documento como "señuelo mínimo de notch1").

La presente descripción desvela que es posible que el antagonista de DLL4 esté unido a un N-terminal o C-terminal, o similares, de una cadena pesada o una cadena ligera del anticuerpo específicamente unido a VEGFR-2 sin limitación, se puede unir a un N-terminal de la cadena pesada o la cadena ligera, o a un N-terminal de la cadena ligera. De acuerdo con una realización de la invención, el antagonista de DLL4 está unido al N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a VEGFR-2.

El anticuerpo de doble diana más preferido referido como PMC-201 proporcionado en la presente invención tiene una forma en la que el antagonista de DLL4, en particular, el señuelo mínimo de Notch1 a DLL4 está ligado al terminal, en particular, el N-terminal de la cadena ligera, del anticuerpo específicamente unido a VEGFR-2. Además se describe que el anticuerpo específico a VEGFR-2 es Tanibirumab y sus variantes.

La "angiogénesis" de la presente invención significa un fenómeno celular en el que las células endoteliales vasculares se proliferan y reconstituyen para formar un nuevo vaso sanguíneo a partir de la red de vaso sanguíneo existente. Los factores de angiogénesis que fomentan la generación del vaso sanguíneo, el crecimiento de célula endotelial, la estabilidad del vaso sanguíneo, y la formación de vaso sanguíneo están implicados en la angiogénesis. Los factores de angiogénesis incluyen los miembros del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la familia de VEGF, la familia del factor de crecimiento placentario (PIGF), la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), DLL4, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el ligando de TIE (angiopoyetina), efrina, Del-1, factor de crecimiento de fibroblasto (ácido (aFGF) y básico (bFGF)), folistatina, factor estimulante de colonia de granulocito (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocito (HGF)/factor de dispersión (SF), interleuquina-8 (IL-8), leptina, midkina, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de célula endotelial derivada de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas, en particular, PDGF-BB o PDGFR-beta, pleiotrofina (PTN), progranulina, proliferina, factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/factor de permeación vascular (VPF), y similares, pero no está particularmente limitado a los mismos.

Un término: "antagonista de angiogénesis" de la presente divulgación significa un material de bajo peso molecular, polinucleótido, polipéptido, proteína aislada, proteína recombinante, anticuerpo, o un conjugado del mismo para un anticuerpo de doble diana, el cual inhibe directa o indirectamente la generación del vaso sanguíneo, la formación de vaso sanguíneo, o la permeabilidad indeseable del vaso sanguíneo. Además, el inhibidor de angiogénesis incluye un material que se une al factor de angiogénesis o un receptor del mismo para impedir que se active la angiogénesis. Por ejemplo, el inhibidor de angiogénesis incluye anticuerpos u otros antagonistas a agentes de angiogénesis tales como VEGF-A o un receptor soluble de VEGF-A (por ejemplo, un receptor KDR soluble o un receptor soluble Flt-1), VEGF-trap, angiopoyetina 2, señuelo del receptor soluble Notch1, o fragmentos que mantienen la afinidad de unión a los ligandos de sus materiales, pero la presente invención no se limita a las mismas.

Como se ha descrito anteriormente, preferentemente, la presente invención proporciona el anticuerpo de doble diana en la forma de un anticuerpo de diana doble que se dirige a VEGFR-2 y DLL4 que comprende un antagonista de DLL4, el cual está unido a un terminal de un anticuerpo que se une a VEGFR-2, en el que el anticuerpo que se une a VEGFR-2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 a 6, en el que el antagonista de DLL4 es el 11° y 12° dominio tipo EGF de unión a calcio de Notch1 humano, y en el que el antagonista de DLL4 está unido al N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de unión a VEGFR-2.

En particular, el anticuerpo específico a VEGFR-2 preferentemente consiste en una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 5, o una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 6. La presente descripción también desvela un anticuerpo específico a VEGFR-2 que incluye además la región constante en la región variable. Se desvelan además fragmentos o modificaciones de aminoácidos del anticuerpo específico a VEGFR-2 siempre y cuando se posea la afinidad de unión a VEGFR-2.

[Tabla 1]

Secuencias de Hv y Lv del anticuerpo que se une a VEGFR-2 según la presente invención			
SEQ NO.	ID	Anticuerpo	Secuencias
1		Región variable de la cadena pesada	AQPAMAQMQL VQSGAEVKKP GASVKLSCKA SGYTFSSYWM HWVRQAPGQR LEWMGEINPG NGHTNYNEKF KSRVTITVDK SASTAYMELS SLRSEDNAVY YCAKIWGPSL TSPFDYWGQG TL
2		Región variable de la cadena pesada	QMQLVQSGAE VKKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVRQA PGQRLEWMGE INPGNGHTNY NEKFKSRVTI TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCAKIW GPSLTSPFDY WGQGT
3		Región variable de la cadena pesada	QMQLVQSGAE VKKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVRQA PGQRLEWMGE INPGNGHTNY NEKFKSRVTI TVDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCAKIW GPSLTSPFDY WGQGT
4		Región variable de la cadena ligera	SGVGSNFMLT QPPSVSVSPG KTARITCRGD NLGDVNVHWY QQRPGQAPVL VMYDADRPS GIPERFSGSN SGNTATLTIS GVEAGDEADY YCQVWDRTSE YVFGTGTKVT VLG
5		Región variable de la cadena ligera	NFMLTQPPSV SVSPGKTARI TCRGDNLGDV NVHWYQQRPG QAPVLVEMYD ADRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGVEAG DEADYCYQVW DRTSEYVFGT GTKVTVLG
6		Región variable de la cadena ligera	NFMLTQPPSV SVSPGKTARI TCRGDNLGDV NVHWYQQRPG QAPVLVEMYD ADRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGVEAG DEADYCYQVW DRTSEYVFGT GTKVEIKRT

Además, el señuelo mínimo de Notch1 para DLL4 según la presente invención preferentemente consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. Sin embargo, También es obvio para los expertos en la técnica que

siempre y cuando se mantenga un antagonismo a DLL4, también se incluyen en el ámbito de la presente invención variantes que tienen variaciones, deleción, e inserción de aminoácidos.

5 En el anticuerpo de doble diana según la invención, el anticuerpo que se une específicamente a VEGFR-2 y el antagonista de DLL4 pueden estar ligados uno con otro mediante diversos procedimientos tales como la unión por un conector, unión químicamente directa, fusión genética, y similares. Preferentemente, el anticuerpo y el antagonista pueden estar ligados por la unión por el conector, más preferentemente, por un conector de aminoácido. El conector de aminoácido preferible según la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

Tabla 2

Secuencias de aminoácidos del señuelo mínimo de Notch1 y el conector de aminoácido según la presente invención			
SEQ NO.	ID	Detalles	secuencias
7		11° y 12° dominio tipo EGF del receptor Notch1	DVDECSLGN PCEHAGKCIN TLGSFECQCL QGYTGPRCEI DVNECVSNPC QNDATCLDQI GEFQCICMPG YEGVHCE
8		conector de aminoácido	SGGGSGGGSGS

10 Por lo tanto, una cadena ligera-un conector de aminoácido-proteína señuelo mínimo de Notch1 del anticuerpo de doble diana en el que el señuelo mínimo de Notch1 a DLL4 está ligado al N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo de doble diana según la presente invención, por el conector de aminoácido tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10.

15 Tabla 3 **Secuencias de aminoácidos de una estructura que comprende la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de doble diana según la presente invención, en la que el señuelo mínimo de Notch1 está unido a la misma**

SEQ NO.	ID	Secuencias
9		DVDECSLGN PCEHAGKCIN TLGSFECQCL QGYTGPRCEI DVNECVSNPC QNDATCLDQI GEFQCICMPG YEGVHCE <u>SGG</u> <u>GGSGGGSGS</u> NFMLTQPPSV SVSPGKTARI TCRGDNLGDV NVHWYQQRPG QAPVLVMYYD ADRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGVEAG DEADYYCQVW DRTSEYVFGT GTKVTVLG
10		DVDECSLGN PCEHAGKCIN TLGSFECQCL QGYTGPRCEI DVNECVSNPC QNDATCLDQI GEFQCICMPG YEGVHCE <u>SGG</u> <u>GGSGGGSGS</u> NFMLTQPPSV SVSPGKTARI TCRGDNLGDV NVHWYQQRPG QAPVLVMYYD ADRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGVEAG DEADYYCQVW DRTSEYVFGT GTKVEIKRT
(las secuencias del conector de aminoácido están subrayadas)		

Además, la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo de doble diana y un vector recombinante que incluye las mismas.

La secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo de doble diana se puede derivar fácilmente de las

secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 10 por los expertos en la técnica. Además, la secuencia líder codificante de polinucleótidos se deja que se coloque en el N-terminal del anticuerpo de doble diana, lo cual es útil en la producción del anticuerpo de doble diana según la presente invención.

5 Un término: "vector recombinante" en la presente invención es un vector de expresión capaz de expresar una proteína diana en una célula hospedadora apropiada, e indica una construcción génica que incluye los elementos controladores esenciales ligados de manera operativa uno a otro para expresar los insertos génicos.

10 Un término: "ligado de manera operativa" en la presente invención significa que las secuencias de regulación de la expresión del ácido nucleico y las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína diana están ligadas de manera funcional una con otra para realizar las funciones generales. Un enlace operable con el vector recombinante se puede llevar a cabo usando tecnologías recombinantes de gen bien conocidas en la técnica, y la escisión de ADN específica a sitio y el enlace se pueden llevar a cabo fácilmente usando enzimas generalmente conocidas en la técnica.

15 Los vectores de expresión apropiados de la presente invención pueden incluir secuencia señal para la dirección de membrana o secreción además de elementos de control de la expresión tales como promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, señal de poliadenilación y un potenciador. El codón de iniciación y el codón de terminación generalmente se consideran como partes de las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína diana inmunológica, y cuando se administra una construcción génica, la función se debería mostrar en un sujeto inyectado y debería estar en la estructura con las secuencias codificantes. Un promotor general puede ser constitutivo o inducible. Las células procariontas tienen promotores de lac, tac, T3 y T7, pero la presente invención no se limita a los mismos. Las células eucariotas tienen el promotor de virus 40 de mono (SV40), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo, el promotor de las repeticiones terminales largas (LTR) de VIH, el promotor del virus Moloney, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus de epstein barr (EBV), el promotor del virus del sarcoma de rous (RSV), y también tiene el promotor de la β -actina, los promotores derivados de hemoglobina humana, creatina de músculo humano, metalotioneina humana, pero la presente invención no se limita a las mismas.

25 El vector de expresión puede incluir un marcador selectivo para la selección de una célula hospedadora que contiene un vector. El marcador selectivo es para investigar una célula transformada con el vector, en la que se pueden usar los marcadores que proporcionan un fenotipo marcador seleccionable tal como resistencia a fármaco, auxotrofia, resistencia a un agente citotóxico, o expresión de una proteína de superficie. Puesto que únicamente las células que expresan el marcador seleccionable sobreviven en el ambiente tratado con el agente selectivo, es posible seleccionar una célula transformada. Además, en el caso en el que el vector es un vector de expresión replicable, el vector puede incluir un origen de replicación que es una secuencia de ácidos nucleicos específica que inicia la replicación.

30 Como vector de expresión recombinante para la inserción de genes extraños, se pueden usar diversos vectores tales como plásmido, virus, cósmido, y similares. El vector recombinante no está específicamente limitado en vista de un tipo siempre y cuando exprese el gen deseado en diversas células hospedadoras de células procariontas y células eucariotas, y produce la proteína deseada; sin embargo, se prefiere un vector capaz de poseer fuerte expresión con el promotor que presenta fuerte actividad mientras produce en masa la proteína extraña en una forma similar a un estado natural.

35 Para expresar el anticuerpo de doble diana según la presente invención, se pueden usar diversas combinaciones hospedador/vector de expresión. Ejemplos de un vector de expresión que es apropiado para el hospedador eucariota incluyen las secuencias reguladoras de expresión derivadas de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus, virus adenoasociado, citomegalovirus, y retrovirus, pero la presente invención no se limita a las mismas. El vector de expresión útil en un hospedador bacteriano incluye plásmidos bacterianos obtenidos de *Escherichia coli*, tal como pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, vector pUC, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 y derivados de los mismos, plásmido que tiene un intervalo grande de hospedador, tal como RP4, ADN fago que incluye significativamente diversos derivados de fago lambda tal como gt10, gt11, NM989 y otros ADN fagos tales como M13 y ADN fago de cadena sencilla filamentoso. Un vector de expresión útil para una célula de levadura es 2 plásmido y derivados del mismo. Un vector útil para una célula de insecto es pVL941.

40 Según otra realización de la presente invención, la presente invención también proporciona una célula hospedadora transformada con el vector recombinante. El vector recombinante se inserta en la célula hospedadora para formar un transformante. Las células hospedadoras apropiadas del vector pueden incluir una célula procarionta tal como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis* o *Staphylococcus* sp. Además, la célula hospedadora puede ser una célula eucariota incluyendo hongos tales como *Aspergillus* sp., levadura tal como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* sp. y *Neurospora crassa*, y otras células eucariotas inferiores y células eucariotas superiores de un insecto. Además, las células hospedadoras pueden ser derivadas de plantas y mamíferos. Preferentemente, están disponibles una célula de riñón de mono 7 (COS7), una célula NSO, SP2/0, una célula de ovario de hámster chino (CHO), W138, una célula de riñón de cría de hámster (BHK), MDCK, línea de célula de mieloma, célula HuT 78 y célula HEK293, y similares, pero la presente invención no se limita a las mismas. En particular, se prefiere una célula CHO.

55 Un término "transformación en una célula hospedadora" en la presente invención puede incluir cualquier procedimiento

en el que los ácidos nucleicos están introducidos en un organismo, una célula, un tejido, o un órgano, y se puede realizar seleccionando tecnología convencional apropiada dependiendo de la célula hospedadora como se conoce en la técnica. El procedimiento para la transformación incluye electroporación, fusión de protoplastos, precipitación de fosfato de calcio (CaPO₄), deposición de cloruro de calcio (CaCl₂), agitación con fibras de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por polietilenglicol (PEG), polietilenimina (PEI), sulfato de dextrano, lipofectamina y sequedad/inhibición; sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos.

Según otra realización de la presente invención, la presente invención proporciona un procedimiento de producción del anticuerpo de doble diana según la presente invención, incluyendo cultivar células hospedadoras transformadas con el vector recombinante.

El anticuerpo de doble diana según la invención preferentemente se obtiene mediante la expresión y la purificación por un procedimiento recombinante génico. Específicamente, la secuencia de gen que codifica una región variable de la cadena pesada o una región entera de la cadena pesada del anticuerpo y la secuencia de gen que codifica una región variable de la cadena ligera o una región entera de la cadena ligera se puede expresar en un vector único o en dos vectores, por separado, en el que el conector de aminoácido y/o la secuencia génica que codifica el antagonista de DLL4 pueden estar ligados a un sitio que corresponde el N-terminal de la cadena pesada o la cadena ligera para inducir la expresión en un sistema de expresión celular, produciendo de ese modo el anticuerpo de doble diana según la presente invención, pero la presente invención no se limita a las mismas.

Específicamente, el procedimiento de producción del anticuerpo de doble diana puede incluir: producir un vector recombinante insertando secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo de doble diana de la presente invención en un vector; transformar el vector recombinante en una célula hospedadora y cultivar el transformante; y aislar y purificar el anticuerpo de doble diana a partir del transformante incubado.

Más específicamente, el anticuerpo de doble diana se puede producir en masa cultivando el transformante que tiene el vector recombinante expresado en un medio nutriente, en el que el medio y la condición de incubación se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de una célula hospedadora. Condiciones tales como temperatura, pH del medio, tiempo de incubación y similares, se pueden controlar apropiadamente para ser apropiadas para el crecimiento y el desarrollo de las células y la producción en masa de la proteína en el momento de cultivar.

El péptido o la proteína producida de manera recombinante como se ha descrito anteriormente se puede recuperar del medio o de la degradación celular. En el caso de un tipo acoplado a membrana, el péptido o la proteína se puede aislar de la membrana usando una solución tensioactiva apropiada (por ejemplo: tritone-X 100) o escisión enzimática. Las células usadas en la expresión del anticuerpo de doble diana se pueden destruir por diversos medios físicos o químicos tales como purificación por congelación-descongelación, tratamiento sónico, daño mecánico y agente de descomposición celular, y se pueden aislar y purificar por tecnología de aislamiento bioquímico general (Sambrook y col., "Molecular Cloning: A laboratory Manual", 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deuschler, M., "Guide to Protein Purification Methods Enzymology", Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)). Están disponibles la electroforesis, la centrifugación, la filtración en gel, la precipitación, la diálisis, la cromatografía (cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía inmunoabsorbente, cromatografía de exclusión por tamaño, y similares), el enfoque isoeléctrico, y diversos cambios y procedimientos complejos, pero la presente invención no se limita a las mismas.

Según otra realización de la presente divulgación, la presente invención proporciona una composición para inhibir la angiogénesis o tratar el cáncer, la composición que incluye el anticuerpo de doble diana. Un término "anti-cáncer" en la presente invención incluye "prevención" y "tratamiento"; en el que "prevención" significa todos los comportamientos en los que el cáncer se inhibe o retrasa mediante la inyección de la composición que contiene los anticuerpos de la presente invención, y "tratamiento" significa todos los comportamientos en los que los síntomas del cáncer se mejoran o cambian de una manera ventajosa mediante la inyección de la composición que contiene los anticuerpos de la presente invención.

Los cánceres o tumores capaces de ser tratados por la composición de la presente invención no están particularmente limitados, pero incluyen tumor sólido y cáncer de la sangre. Preferentemente, ejemplos de cáncer incluyen cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer bronquial, cáncer nasofaríngeo, cáncer de laringe, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cuello de útero, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de huesos, el cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer de riñón, cáncer esofágico, cáncer de conductos biliares, cáncer de testículos, cáncer rectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de uréter, osteosarcoma, neurocitoma, melanoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, astrocitoma, neuroblastoma, neuroglioma y similares.

La composición anti-cáncer de la presente invención puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, se pueden usar un aglutinante, un lubricante, un desintegrante, un excipiente, un solubilizante, un dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, pigmento, aromatizante, y similares. Para una inyección, se pueden mezclar para ser usados un agente tampón, un conservante, un lenitivo, un agente solubilizante, un agente isotónico, un estabilizante. Para la administración tópica, se pueden usar una sustancia básica, un excipiente, un lubricante, un conservante, y similares. La composición farmacéutica de la presente invención se

puede mezclar con el vehículo farmacéuticamente aceptable anteriormente descrito para tener diversas formulaciones. Por ejemplo, para administración oral, la formulación se puede formar como comprimidos, trociscos, cápsulas, elixir, suspensión, jarabe, oblea y similares. Para inyección, la formulación se puede preparar en una única ampolla de dosis unitaria o en una forma de dosificación múltiple. Además, la composición anti-cáncer normalmente puede incluir un tensioactivo que facilita el movimiento incluyendo el paso a través de las membranas. Ejemplos del tensioactivo incluyen materiales derivados de esteroides, lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diversos compuestos tales como hemisuccinato de colesterol, fosfatidil glicerol y similares.

Según otra realización de la presente invención, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer e inhibición del crecimiento del cáncer administrando el anticuerpo de doble diana o la composición que contiene el anticuerpo de doble diana de la presente invención a un sujeto. La composición que contiene el anticuerpo de doble diana según la presente invención se puede administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para tratar la célula cancerosa o su metástasis o para inhibir el crecimiento del cáncer. La cantidad de administración puede variar según diversos factores tales como tipo de cáncer, edad y peso corporal de un paciente, características y gravedad de los síntomas, tipos del presente tratamiento, el número de tratamientos, tipo de administración y vía, y similares, y se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica correspondiente. La composición de la presente invención se puede administrar junto con los ingredientes farmacológicos y fisiológicos anteriormente descritos, o se pueden administrar secuencialmente. Además, la composición de la presente invención se puede administrar en combinación con el agente terapéutico convencional adicional, y se puede administrar secuencialmente o simultáneamente con los agentes terapéuticos convencionales. La administración puede ser una administración única o múltiple. Es importante administrar una cantidad a la cual se obtiene el efecto máximo con una cantidad mínima sin efectos secundarios en consideración con todos los factores anteriormente descritos, y puede ser fácilmente determinada por los expertos en la técnica.

En la presente invención, un término "sujeto" significa un mamífero que padece de una afección o trastorno que hay que aliviar, inhibir o tratar, o con dicho riesgo, administrando el anticuerpo de doble diana según la presente invención, preferentemente, un ser humano.

En la presente invención, un término "administración" significa una introducción de un material predeterminado en un sujeto mediante cualquier procedimiento apropiado, en el que la composición que contiene el anticuerpo de doble diana de la presente invención se puede administrar por cualquier vía general siempre y cuando la composición llegue a un tejido deseado. Se puede usar administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intradérmica, administración oral, administración tópica, administración intranasal, administración intrapulmonar, administración intrarrectal, pero la presente invención no se limita a las mismas. Sin embargo, puesto que la proteína se digiere en el caso de la administración oral, se prefiere que se proporcione una composición oral mediante el recubrimiento de un agente activo sobre la misma o que se formule para proteger la composición de ser digerida en el estómago. Además, la composición farmacéutica se puede administrar mediante cualquier aparato en el que un agente activo es móvil a una célula diana.

Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento de medición de la eficacia antagonista de DLL4 del anticuerpo de doble diana, incluyendo el procedimiento que mide la actividad de Notch 1 mediante el cocultivo de una línea celular que expresa DLL4 humana (hDLL4) o una línea celular recombinante con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).

En la presente divulgación, la actividad de Notch 1 se caracteriza midiendo una cantidad de expresión de NICD, y cuándo el ligando de Notch se une al receptor Notch, en primer lugar se activa una metaloproteasa ADAM para escindir un sitio proximal exterior de la membrana celular del receptor Notch y, a continuación, se activa un complejo gamma-secretasa para escindir un sitio proximal interno de la membrana celular del receptor Notch, de modo que el dominio intracelular de Notch (NICD) se aísla y migra dentro del núcleo. NICD se une a un factor de transcripción RBPJ/CSL para inducir la expresión de los genes diana de Notch tal como proteínas hélice-bucle-hélice básicas incluyendo Hes y Hey.

La medición de la cantidad de expresión de NICD se realiza mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en SDS-PAGE, transferencia Western, tinción inmunohistoquímica, inmunotinción, inmunofluorescencia, ensayo ELISA (medidas directas), y ensayo de luciferasa (medida indirecta), pero se puede realizar por cualquier procedimiento conocido para medir la expresión de proteína en la técnica sin limitación. En la presente divulgación, la cantidad de expresión de NICD se midió preferentemente por transferencia Western.

Específicamente, el cocultivo de la línea celular que expresa DLL4 humana (hDLL4) o la línea celular recombinante con HUVEC se puede realizar incluyendo las etapas de (a) cultivar HUVEC; y (b) hacer reaccionar la línea celular 293 que sobreexpresa hDLL4 (293-hDLL4) y el anticuerpo de doble diana y realizar el tratamiento en la HUVEC cultivada en la etapa (a) para conseguir el cocultivo. Se confirmó que la cantidad de expresión de NICD mostrada por la activación de Notch-1 se redujo por el anticuerpo de doble diana PMC-201 mediante el procedimiento de cocultivo en los Ejemplos de la presente invención.

Además, según el procedimiento para medir la eficacia antagonista de hDLL4 del anticuerpo de doble diana que se caracteriza por que la actividad de Notch 1 se mide por la cantidad de expresión de NICD, la actividad del promotor

de NICD se puede medir con la cantidad de NICD usando un procedimiento del ensayo de luciferasa, y la eficacia antagonista de hDLL4 del anticuerpo de doble diana se puede medir tratando y cultivando la HUVEC y el anticuerpo de doble diana PMC-201 en placas recubiertas con hDLL4 y midiendo la cantidad de NICD en la HUVEC, como se confirma en otros Ejemplos de la presente invención.

- 5 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle en referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proporcionan solamente para ilustrar la presente invención, y será obvio para los expertos de la técnica que no se interpreta el ámbito de la presente invención está limitado por estos ejemplos.

10 **Ejemplo 1 Producción del vector de expresión para la producción temporal del anticuerpo de doble diana PMC-201**

El ADN que codifica el señuelo mínimo de Notch1 (dominios tipo EGF de unión a calcio 11 y 12 de un Notch1) unido a hDLL4 se obtuvo mediante la síntesis génica (incluyendo optimización génica, GeneArt, Alemania) después de identificar las secuencias de bases de aminoácidos (FIG. 1 y SEQ ID NO: 7) del correspondiente dominio.

- 15 Secuencias de bases de 77 aminoácidos se clonaron con el N-terminal de la cadena ligera del vector de expresión de Tanibirumab (véase TTAC0001 desvelado en la solicitud de patente internacional N.º PCT/KR07/003077), usando un conector G4S (S GGGG SGGGGS GS) que consiste en 13 aminoácidos para producir un vector de expresión del anticuerpo de doble diana PMC-201 con expresión optimizada en la línea celular 293-T (ATCC, CRL-11268™) (FIG. 2). El vector recombinante confirmado se denominó "PMC-201-v213".

20 **Ejemplo 2: Producción e identificación del anticuerpo de doble diana PMC-201**

- Se indujo la expresión aleatoria del vector de expresión completado PMC-201-v213 en una célula 293T mediante transducción, y se confirmó la ocurrencia de la expresión por SDS-PAGE y transferencia Western. La transducción se usó mediante lipofectamine™ 2000 (Invitrogen N.º 11668-019, EE.UU.), y se siguió por la instrucción del fabricante. En resumen, se inocularon 5 x 10⁵ células 293T por pocillo en placas de 6 pocillos que contenían medio αMEM (Welgene, República de Corea) y, a continuación, se dejaron reposar en incubadora humidificada de CO₂ (5 %) a 37 °C durante 24 horas, consiguiendo de ese modo cultivo denso que tenía una densidad celular de aproximadamente 80 % a 90 %. Se diluyeron 2 µg del vector recombinante (PMC-201-v213) y 6 µl de lipofectamin™ 2000 en 250 µl de medios αMEM libres de suero, respectivamente, y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

- 30 Se mezcló una solución en dilución de ADN con solución en dilución de lipofectamin™ 2000 y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos, para formar el complejo de ADN- lipofectamin™ 2000. Después el medio existente se separó de la célula incubada, se añadieron 500 µl del complejo ADN-lipofectamin™ 2000 y 500 µl de medio αMEM libre de suero a cada pocillo, y se incubó en un incubadora de CO₂ a 37 °C durante 6 horas. Se añadió al mismo 1 ml de medio αMEM que contenía 20 % de suero fetal bovino dializado y se incubó durante 48-72 horas. Después, solamente se separó el sobrenadante, y se confirmó por SDS-PAGE si el anticuerpo se expresaba o no. El SDS-PAGE se realizó mediante procedimientos conocidos en la técnica, y se usaron muestras tal como sigue: gel de 35 12 % SDS-poliacrilamida, membrana de PVDF (Millipore N.º IPVH00010, EE. UU.), anticuerpo anti-IgG(kappa) humana de cabra conjugado con HRP, y el anticuerpo anti-IgG(Fc) humana de cabra conjugado con HRP (Pierce, EE.UU).

- 40 Como resultado, se confirmó por SDS-PAGE y transferencia Western que el anticuerpo de doble diana PMC-201 se expresaba, y se obtuvieron anticuerpos purificados que tenían pureza del 95 % o más por cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) usando columna de afinidad de Proteína A, columna de SP-sefarosa, y columna de exclusión por tamaño (FIG. 3).

45 **Ejemplo 3: Ensayo de afinidad de unión del anticuerpo de doble diana PMC-201**

3-1: Ensayo de afinidad de unión a VEGFR-2 y hDLL4

- Se realizó un ensayo de afinidad de unión que confirmaba si el anticuerpo de doble diana PMC-201 se unía o no a VEGFR-2 y hDLL4 usando ELISA. 1 µg/ml de los dominios extracelulares 1 a 3 de VEGFR-2 (en lo sucesivo referido en el presente documento como VEGFR-2 ECD) y DLL4 se dividieron cada uno y se recubrieron en una placa de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 2 horas, y se realizó una reacción de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas, usando leche desnatada al 2 %/PBS.

- 50 Después las placas tras terminar el bloqueo se lavaron con PBS, se añadieron Tanibirumab y PMC-201 previamente preparados a diversas concentraciones (0,18 a 3.000 ng/ml) a temperatura ambiente a pocillos recubiertos con VEGFR-2 ECD o hDLL4, y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de que se completara la reacción, el producto se lavó con PBS y, a continuación, se añadió dilución 1:2.000 de anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (Pierce, EE.UU.) como un anticuerpo secundario y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se indujo una reacción colorimétrica por el reactivo de sustrato TMB (BD Biosciences N.º 555214, EE.UU.) y se paró añadiendo 50 µl de solución de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄). La medida de la reacción colorimétrica se realizó a absorbancia de 450 nm y 650 nm usando un lector de microplaca (Tecan, Suiza).

Como resultado, se confirmó que Tanibirumab y PMC-201 tenían afinidad de unión similar en VEGFR-2; sin embargo, se confirmó que solamente el PMC-201 tenía afinidad de unión similar en hDLL4 (FIG. 4).

3-2: Análisis de afinidad de PMC-201 y DLL4 humana

5 Para calcular la Kd (constante de disociación) de PMC-201 a DLL4 humana, se usó BIACORE® 3000 (GE Healthcare), y se usó chip CM5. La constante de disociación es similar al valor de Km, y se usó como índice de afinidad de una enzima a un sustrato en un complejo de enzima-sustrato. La afinidad entre la enzima y el sustrato se incrementa cuando se disminuye la constante de disociación.

10 La muestra se inmovilizó usando EDC (N-etil-N'-(dimetilaminopropil) Carbodiimida) 400 mM, se diluyeron NHS (N-Hidroxisuccinimida) 100 mM, y clorhidrato de etanolamina 1 M (pH 8,5) que son un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare), e hidróxido de sodio 20 mM como tampón de generación, y 1XPBS como tampón de inmovilización y, a continuación, la muestra de análisis se diluyó 1:40 en acetato 10 mM (pH 5,0) (GE Healthcare). La muestra se inmovilizó a 4000 UR (Unidad de respuesta). Un tampón para medir la adsorción de la muestra de análisis era un tampón HBS-EP (GE Healthcare). Se diluyeron en serie DLL4 que tenían concentraciones de medida de 4,9, 9,7, 19,5, 39,1, 78,1, 156,3, 312,5 nM como antígeno para tener un volumen final de 200 µl usando un tampón HBS-EP. Se seleccionaron cinco concentraciones de siete concentraciones y se ajustaron. Se seleccionó una concentración del tampón de generación usado mediante la confirmación con aproximadamente 10 % más de una línea base usando hidróxido de sodio, después la muestra (156,3 nM) se sometió a una etapa de unión y una etapa de disociación para experimento preliminar antes del análisis real. La afinidad de la muestra de análisis se midió bajo condiciones en las que una tasa de flujo del análisis era de 30 µl/min, una sección de unión era de 60 segundos, y una disociación era de 300 segundos.

20 Como resultado del análisis de la afinidad para cada lote, se confirmó cada afinidad en PMC-201 y Notch-1 Fc, y el anticuerpo de doble diana PMC-201 de la presente invención tenía afinidad en comparación con Notch-1 Fc (FIG. 5).

3-3: Medida de la afinidad de unión de hDLL4 y PMC-201 expresada sobre la superficie celular

Se usaron ELISA y Biacore para medir la afinidad de unión de PMC-201 a hDLL4 inmovilizada en una fase sólida, se realizó análisis FACS para confirmar si PMC-201 se unía o no a hDLL4 expresada sobre la superficie celular (FIG. 6).

25 En primer lugar, para producir el conjunto 293 y una línea celular que expresa hDLL4 (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12), la secuencia codificante de hDLL4 (secuencia SEQ ID NO: 11) en la que se realizó la optimización del gen se clonó en las posiciones BamHI y EcoRI de la enzima de restricción de pcDNA3.1 (+) por Geneoptimizer de GeneArt para construir pcDNA-hDLL4. Después, el vector pcDNA-hDLL4 se sometió a transducción en células 293. La transducción se usó utilizando lipofectamine™ 2000 (Invitrogen N.º 11668-019, EE.UU.), y se siguió por la instrucción del fabricante. En resumen, se inocularon 1×10^6 células 293 en placas de pocillos de 100 mm que contenían medio α MEM (Welgene, República de Corea) y, a continuación, se incubaron en incubadora humidificada de CO₂ (5 %) a 37 °C durante 24 horas para tener densidad celular de aproximadamente 20 %. Se diluyeron 16 µg del vector (DLL4 pcDNA3.1) y 40 µl de lipofectamin™ 2000 en 1 ml de medio α MEM libre de suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y, a continuación, la solución en dilución de ADN se mezcló con solución en dilución de lipofectamin™ 2000, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos para formar un complejo ADN-lipofectamin™ 2000. Después de que el medio existente se separa de la células incubadas, se añadieron 1 ml del complejo ADN-lipofectamin™ 2000 y 9 ml del medio α MEM libre de suero a cada pocillo, y se incubaron en un incubadora humidificada de CO₂ a 37 °C durante 6 horas, a continuación, el medio se reemplazó con medio DMEM que contenía 10 % de suero fetal bovino dializado. Después, el medio se incubó a 37 °C durante 72 horas, las células se separaron por Tripsina-EDTA y, a continuación, se añadieron medio DMEM que contenía 10 % de suero fetal bovino dializado y neomicina (G418, 500 µg/ml) y se incubaron. Después de 72 horas, el medio se reemplazó con un medio del que se incrementó la concentración de G418 en 1 mg/ml, y se incubó bajo la misma condición durante aproximadamente 1 semana hasta que se formaron las colonias. Cada colonia se trató con Tripsina-EDTA en placas que tenían colonias formadas en las mismas, y se movió a una placa de 24 pocillos. Se añadieron medio DMEM que contenía 10 % de suero fetal bovino dializado y neomicina (G418, 500 µg/ml) y se incubaron, y todas las colonias en desarrollo se recogieron y se incubaron en un estado de conjunto.

Después de 1 semana, se realizó análisis FACS con anticuerpo anti-hDLL4 (Biolegend EE.UU.) en un estado en conjunto para confirmar la expresión de hDLL4, y 23 tipos de colonias sencillas se seleccionaron y se subincubaron en placa de 6 pocillos y placa de 100 mm, respectivamente y se incubaron en medio DMEM que contenía 10 % de suero fetal bovino dializado y neomicina (G418, 500 µg/ml). Se seleccionó un tipo de célula que expresaba de manera favorable hDLL4 entre las colonias sencillas, y se denominó 293-hDLL4 y se usó para el análisis relacionado con la eficacia antagonista de DLL4 de PMC-201.

55 El análisis FACS se llevó a cabo para confirmar que PMC-201 se unía de manera favorable al conjunto de 293-DLL4. En primer lugar, se incubó un número suficiente (1×10^6 o más por muestra de FACS) del conjunto 293-DLL4, y se produjo como célula sencilla con tripsina-EDTA y se añadió 2 ml de tampón 1x FACS (0,2 % de BSA en PBS) y se mezcló bien, seguido de centrifugación a 1.200 rpm durante 3 minutos. Se descargó un sobrenadante y las células en el fondo en primer lugar se tiñeron con concentración 10 nM de PMC-201, Notch-1 Fc y Tanibirumab con hielo durante 20 minutos, se lavaron con tampón 1xFACS, y se tiñeron en segundo lugar (20 minutos en hielo) con anticuerpo anti-

Fc humano con PE y se lavaron. Después, citometría de flujo; se usó FACSCalibur para la medición.

Como resultado obtenido al medir si PMC-201 se unía o no a hDLL4 expresada sobre la superficie celular, se confirmó que PMC-201 tenía afinidad de unión similar a Notch-1 Fc (FIG. 6).

Ejemplo 4: Análisis de la capacidad de proliferación de HUVEC después de tratamiento del anticuerpo doble diana PMC-201

Se realizó análisis de la capacidad de proliferación celular para confirmar el cambio en la capacidad de proliferación de la célula endotelial de la vena umbilical humana (HUVEC) (Lonza, Suiza), después del tratamiento del anticuerpo de doble diana PMC-201 según la presente invención. Se incubó HUVEC usando medio M199 libre de rojo fenol (Invitrogen, EE.UU.) que contenía 20 % de suero fetal bovino (Hyclone, EE.UU.), 100 unidades/ml de penicilina (Hyclone, EE.UU.), 100 µg/ml de estreptomycin (Hyclone, EE.UU.), 3 µg/ml de factor de crecimiento de fibroblasto (Upstate Biotechnology, EE.UU.) 5 unidades/ml de heparina (Sigma-Aldrich, EE. UU.), en un incubadora a 37 °C con aire mezclado humidificado con CO₂ al 5 %. Estas células se incubaron en placas de 24 pocillos a densidad de 2 x 10⁴ células/pocillo durante 24 horas para analizar la tasa de supervivencia de HUVEC. Después, las células se lavaron con medio M199 dos veces, y se incubaron bajo una condición de baja concentración de suero en medio M199 que contenía 1 % de suero fetal bovino (Hyclone, EE.UU.) durante 6 horas. Se trataron previamente diversas concentraciones de anticuerpos en células durante 30 minutos, y se trataron con 20 ng/ml de VEGF (R&D systems, EE. UU.). Después de la incubación durante 48 horas, las células se trataron con WST-8 (Dojindo, Japón) durante 2 horas, se midió la absorbancia a 450 nm de longitud, y se comparó una con otra la capacidad de proliferación celular bajo cada condición.

Como resultado, se confirmó a partir del ensayo de la capacidad de proliferación celular sobre HUVEC inicialmente incubada que el anticuerpo de doble diana PMC-201 podría inhibir más fuertemente la capacidad de proliferación de HUVEC inducida por VEGF en comparación con el anticuerpo parental Tanibirumab (FIG. 7).

Ejemplo 5: Análisis de la capacidad de unión a DLL4 humana competitiva usando FACS

Se realizó análisis FACS para confirmar si PMC-201 se unía o no de manera competitiva a hNotch1-Fc unido a la línea celular 293-hDLL4. En primer lugar, se incubó un número suficiente (1 x 10⁶ o más células por muestra FACS) de 293-hDLL4 y se trataron con Tripsina-EDTA para aislarse en células sencillas y, a continuación, se añadió 2 ml de tampón 1 X FACS (0,2 % de BSA en PBS). Después, las células sencillas aisladas se recuperaron y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos y, a continuación, se descargó el sobrenadante. Se añadieron 16 µg/ml de Tanibirumab o PMC-201 y 1 µg/ml de rhNotch1-Fc que se había marcado con Alexa-488 (Zenon, N.º Z-25402) a las células en el fondo, en primer lugar se tiñeron en hielo durante 30 minutos, se lavaron con tampón 1x FACS, y se midieron por citometría de flujo (FACSCalibur).

Como resultado, se confirmó que la unión de rhNotch1-Fc unida a la HUVEC se disminuyó cuatro veces en consideración con la media geométrica por PMC-201. Mientras tanto, Tanibirumab no pudo inhibir la unión del anticuerpo rhNotch1-Fc, el cual es similar a un grupo de anticuerpo no tratado (FIG. 8).

Ejemplo 6 Análisis de la actividad del promotor por Notch-1

Se incubaron 1x10⁵ células LS174T (línea celular de cáncer de colon; ATCC, CL-188™) en medio RPMI que contenía 10 % de suero fetal bovino durante 24 horas, y se mezclaron 0,8 µg del ADN indicador de Notch Signal contenido en el kit de ensayo de indicador Cignal (N.º 336841 CCS-014L, QIAGEN) y 2 µl de lipofectamine (N.º 11668-500; Invitrogen) con 100 µl de medios opti-MEM y se dejó reposar durante 20 minutos y, a continuación, se añadió 400 µl de opti-MEM para transfección para incubar células durante 6 horas. Después de 6 horas, el medio se reemplazó con un medio MEM que contenía 10 % de suero fetal bovino, y se incubaron durante la noche. Al siguiente día, se mezclaron Tanibirumab y PMC-201 (cada uno de 20 mg/ml) y se trataron previamente en 1x10⁵ células 293-hDLL4 durante 1 hora, a continuación, se cocultivaron con células LS174T sometidas a transfección con ADN indicador de Notch Signal durante 24 horas. DAPT (5 mM) no se trató previamente y la célula 293-hDLL4 se mezcló con las células LS174T transfectadas, y se cocultivaron durante 24 horas.

En general se sabe que DAPT N-[N-(3,5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster) inhibe la actividad de Notch 1 e inhibe la actividad de γ-secretasa para disminuir un incremento en la producción de NICD (Andrea Geling y col., *EMBO Rep.*, :3(7):688, 2002; le-Ming Shih and Tian-Li Wang, *Cancer Research*, 67:1.879, 2007).

Después del cocultivo durante 24 horas, las células se sometieron a lisis usando un tampón de lisis contenido en el sistema de ensayo de indicador de luciferasa doble (N.º Cat. E1910;Promega), y un sustrato y ATP se mezclaron uno con otro y, a continuación, se midió la cantidad de luminiscencia usando Luminómetro.

Como resultado, se confirmó que la activación del promotor de NICD mostrada por la activación de Notch-1 de las células LS174T se disminuyó en células tratadas con el anticuerpo de doble diana PMC-201, similar a los grupos de tratamiento con DAPT, en comparación con el grupo comparativo que tenía anticuerpo no tratado (FIG. 9).

Ejemplo 7: Análisis del incremento en el dominio intracelular de Notch (NICD) por activación de Notch-1

5 Se recubrió 1 µg/ml de concentración de hDLL4 recombinante con placas de 6 pocillos durante la noche (16 horas), y se lavó con 1xPBS. Se trataron IgG humana (hIgG), Tanibirumab, PMC-201 (20 µg/ml) en cada pocillo durante 1 hora, y se separaron las soluciones de anticuerpo tratadas. Se mezclaron uno con otro 5x10⁵ HUVEC y IgG, Tanibirumab, PMC-201 (20 µg/ml) y se trataron en placas de 6 pocillos, respectivamente. Después de 24 horas de incubación, las células se sometieron a lisis usando un tampón de lisis (final 1 % de SDS, Na₃VO₄ 1 mM, 1x cóctel de inhibidor de proteasa), y se recogió la solución celular y se transfirió a un tubo Eppendorf, y se calentó a 95 °C durante 10 minutos y se enfrió en hielo. La proteína se cuantificó usando el procedimiento de cuantificación BCA, y se midió NICD mediante el mismo procedimiento que la transferencia Western del Ejemplo 2.

10 En este caso, un anticuerpo principal era dilución 1:1.000 de anticuerpo (Va11744) (D3B8) (Conejo) de Notch1 escindido, el anticuerpo de β-actina (Conejo) estaba en dilución 1:2.000 en leche desnatada conteniendo 5 % 0,05 % de TBST, y un anticuerpo secundario era dilución 1:1.000 de anti-IgG de conejo (R&D HAF008).

Como resultado, Se confirmó que una cantidad de NICD mostrada por la activación de hNotch-1 en la célula HUVEC se disminuía disminuyó significativamente por el anticuerpo de doble diana PMC-201 que se dirige a DLL4 en comparación con Tanibirumab que es un anticuerpo parental (FIG. 10).

15 Mientras tanto, se realizó un procedimiento de análisis de detección de solamente NICD por cultivo celular y cocultivo sin recubrimiento de hDLL4 tal como sigue.

20 En primer lugar, se incubó 5x10⁵ células/pocillo de HUVEC en placas de 6 pocillos durante 24 horas. Después, se trataron 2,5x10⁵ células/pocillo de 293-hDLL4 (línea celular 293 de sobreexpresión de DLL4 humana) y hIgG, Se trataron PMC-201 (10 µg/ml) DAPT (5 µM) durante 1 hora, y los anticuerpos (hIgG, PMC-201) y las células 293-hDLL4 tratadas con DAPT se añadieron a HUVEC inicialmente incubada en placas de 6 pocillos, sin separar la solución de anticuerpo, y se cocultivaron durante 24 horas. Como grupo comparativo, se trató la línea de célula 293-T y se cocultivó con HUVEC.

25 Después del cocultivo durante 24 horas, las células se sometieron a lisis usando un tampón de lisis (final 1 % de SDS, Na₃VO₄ 1 mM, 1x cóctel inhibidor de proteasa), y se recogió la solución celular y se transfirió a un tubo Eppendorf, y se calentó a 95 °C durante 10 minutos y se enfrió en hielo. La proteína se cuantificó usando el procedimiento de cuantificación BCA, y se midió NICD mediante el mismo procedimiento que la transferencia Western del Ejemplo 2.

Como resultado, se confirmó que una cantidad de NICD mostrada por la activación de hNotch-1 en la célula HUVEC se disminuyó para ser menos del 50 % del anticuerpo de doble diana PMC-201 que se dirige a DLL4 en comparación con hIgG (FIG. 11).

30 **[Aplicabilidad industrial]**

35 El anticuerpo de doble diana según la presente invención puede inhibir más eficazmente y simultáneamente la señalización de dos rutas, VEGF/VEGFR-2 y DLL4/Notch1, tratando de ese modo diversas enfermedades relacionadas con la angiogénesis tales como tumor, y similares, y en particular, superando la resistencia causada usando un agente terapéutico neovascular solo, y previniendo fundamentalmente la recurrencia del cáncer por células madre de cáncer directamente dirigidas.

Por lo tanto, el anticuerpo de doble diana según la presente invención y la composición farmacéutica que incluye el mismo se pueden usar eficazmente para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis, particularmente, cáncer.

40 La presente invención se ha descrito en detalle basándose en sus características particulares, y es obvio para los expertos en la técnica que estas tecnologías específicas son realizaciones simplemente preferibles y, por tanto, el ámbito de la presente invención está limitada a las realizaciones. Por lo tanto, el ámbito sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y su equivalente.

<110> PharmAbcine Inc.

45 <120> Anticuerpo biespecífico que se dirige a VEGFR-2 y DLL4 y composición farmacéutica que comprende el mismo

<130> PP-B1277

<150> KR 2012-0132431

<151> 21-11-2012

<160> 12

50 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 122

ES 2 744 267 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada variable de anti-VEGFR-2

5

<400> 1

```

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 1           5           10           15
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20           25           30
Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 35           40           45
Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr
 50           55           60
Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys
 65           70           75           80
Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 85           90           95
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Ile Trp Gly Pro Ser Leu Thr Ser
 100          105          110
Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115          120
    
```

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cadena pesada variable de anti-VEGFR-2

<400> 2

ES 2 744 267 T3

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ile Trp Gly Pro Ser Leu Thr Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu
 115

<210> 3
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada variable de anti-VEGFR-2
 <400> 3

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ile Trp Gly Pro Ser Leu Thr Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu
 115

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

ES 2 744 267 T3

<220>

<223> cadena ligera variable de anti-VEGFR-2

<400> 4

```

Ser Gly Val Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser
 1           5           10           15
Val Ser Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu
           20           25           30
Gly Asp Val Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro
           35           40           45
Val Leu Val Met Tyr Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu
 50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
 65           70           75           80
Gly Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp
           85           90           95
Arg Thr Ser Glu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
           100           105           110

```

Gly

5

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera variable de anti-VEGFR-2

<400> 5

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Lys
 1           5           10           15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val
           20           25           30
His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
           35           40           45
Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50           55           60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly
 65           70           75           80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr
           85           90           95
Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
           100           105

```

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

ES 2 744 267 T3

<220>

<223> cadena ligera variable de anti-VEGFR-2

<400> 6

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Lys
 1                5                10                15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val
                20                25                30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
                35                40                45

Tyr Asp Ala Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
                50                55                60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly
 65                70                75                80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr
                85                90                95

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
                100                105
    
```

5

<210> 7

<211> 77

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> señuelo mínimo de Notch1

<400> 7

```

Asp Val Asp Glu Cys Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly
 1                5                10                15

Lys Cys Ile Asn Thr Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly
                20                25                30

Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Val Ser Asn
                35                40                45

Pro Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln
 50                55                60

Cys Ile Cys Met Pro Gly Tyr Glu Gly Val His Cys Glu
 65                70                75
    
```

15

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector de aminoácido

<400> 8

20

```

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 1                5                10
    
```

<210> 9

<211> 198

ES 2 744 267 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo biespecifico (señuelo mínimo de Notch1 de la cadena ligera)

5

<400> 9

```

Asp Val Asp Glu Cys Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly
 1          5          10          15

Lys Cys Ile Asn Thr Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly
          20          25          30

Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Val Ser Asn
          35          40          45

Pro Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln
 50          55          60

Cys Ile Cys Met Pro Gly Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Ser Gly Gly
 65          70          75          80

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln
          85          90          95

Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile Thr Cys
          100          105          110

Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg
          115          120          125

Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr Tyr Asp Ala Asp Arg Pro
 130          135          140

Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala
 145          150          155          160

Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
          165          170          175

Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr
          180          185          190

Lys Val Thr Val Leu Gly
          195
    
```

<210> 10

<211> 199

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> anticuerpo biespecifico (señuelo mínimo de Notch1 de la cadena ligera)

<400> 10

ES 2 744 267 T3

Asp Val Asp Glu Cys Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly
 1 5 10 15
 Lys Cys Ile Asn Thr Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly
 20 25 30
 Tyr Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Val Ser Asn
 35 40 45
 Pro Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln
 50 55 60
 Cys Ile Cys Met Pro Gly Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Ser Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln
 85 90 95
 Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile Thr Cys
 100 105 110
 Arg Gly Asp Asn Leu Gly Asp Val Asn Val His Trp Tyr Gln Gln Arg
 115 120 125
 Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr Tyr Asp Ala Asp Arg Pro
 130 135 140
 Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr
 165 170 175
 Cys Gln Val Trp Asp Arg Thr Ser Glu Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr
 180 185 190
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 195

<210> 11

<211> 2058

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ADN de DLL4 humana

<400> 11

atggccgctg ccagcagatc tgcctctggc tgggctctgc tgctgctggt ggctctgtgg 60
 cagcagagag ccgccggaag cggcgtgttc cagctgcagc tccaggagtt catcaacgag 120
 cggggcgtgc tggccagcgg cagaccttgt gaaccggct gccggacctt cttcagagtg 180
 tgcctgaagc acttccaggc cgtgggtgcc cccggaccct gcacctttgg caccgtgtcc 240
 acaccgtgc tgggcaccaa cagcttcgcc gtgcgggacg atagcagcgg cggaggcaga 300

ES 2 744 267 T3

aacccccctgc agctgccctt caacttcacc tggccccggca ccttcagcct gatcatcgag 360
gcctggcacg cccctggcga cgacctgag cctgaagccc tgcctcccga cgccctgatc 420
agcaagatcg ccatccaggg cagcctggcc gtgggccaga actggctgct ggacgagcag 480
accagcacc tgacccggct gcggtacagc tacagagtga tctgcagcga caactactac 540
ggcgacaact gcagccggct gtgcaagaag cggaacgacc acttcggcca ctacgtgtgc 600
cagcccagc gcaacctgag ctgcctgcct ggatggaccg gcgagtactg ccagcagccc 660
atctgcctga gcggctgcc aagcagaac ggctactgca gcaagcccgc cgagtgcctg 720
tgcagacctg gctggcaggg cagactgtgc aacgagtgca tccccacaa cggctgccgg 780
cacggcacct gtagcaccct ctggcagtgc acctgtgacg agggctgggg cggactgttc 840
tgtgatcagg acctgaacta ctgcaccac cacagcccct gcaagaacgg cgccacatgc 900
agcaacagcg gccagcggag ctacacctgt acctgcagac ccggctacac cggcgtggac 960
tgcgagctgg aactgagcga gtgcgacagc aacccctgcc ggaatggcgg cagctgcaag 1020
gaccaggaag atggctacca ctgcctgtgc cccctggct actacggcct gcaactgcgag 1080
cacagcacc tgcctgcgc cgactcccc tgccttaacg gcggctcctg cagagagcgg 1140
aaccagggcg ccaactacgc ctgcgagtgc ccccccaatt tcaccggcag caactgcgag 1200
aagaaagtgg accggtgcac ctccaacccc tgcgccaatg gcggacagt cctgaacaga 1260
ggccccagcc ggatgtgcag atgcaggcct ggcttcaccg gcacctattg cgagctgcac 1320
gtgtccgact gcgcccggaa tccttgtgcc cacggcggca cctgtcacga cctggaaaac 1380
ggcctgatgt gcacctgtcc tgccggcttc agcggggcga gatgcgaagt gcggaccagc 1440
atcgatgcct gcgcctccag cccctgcttc aaccgggcca cctgttacac cgacctgagc 1500
accgacacct tcgtgtgcaa ctgcccctac ggcttcgtgg gcagcagatg cgagttcccc 1560
gtgggcctgc ccccagctt tccttgggtg gccgtgtctc tgggcgtggg cctggctgtg 1620
ctgtggtcc tgctgggaat ggtggccgtg gctgtgcggc agctgagact gagaaggccc 1680
gacgacggca gccgcgaggc catgaacaac ctgagcgact tccagaagga caacctgatc 1740
cctgcccgcc agctgaagaa caccaaccag aaaaaagagc tggaagtcga ctgcggcctg 1800
gacaagagca actgcccga gcagcagaac cacaccctgg actacaacct ggcccctggc 1860
cctctgggca gaggcacat gcctggcaag tccccccaca gcgacaagag cctgggcgag 1920
aaggcccccc tgagactgca cagcgagaag cccgagtgcc ggatcagcgc catctgcagc 1980
cccagagaca gcatgtacca gagcgtgtgc ctgatctccg aggaacggaa cgagtgcgtg 2040
atcgccaccg aagtgtga 2058

<210> 12
<211> 686
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 744 267 T3

<220>

<223> secuencia de aminoácido de DLL4 humana

<400> 12

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
 20 25 30

Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
 35 40 45

Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
 50 55 60

Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
 65 70 75 80

Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
 85 90 95

Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
 100 105 110

Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp
 115 120 125

Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala
 130 135 140

Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln
 145 150 155 160

Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
 165 170 175

Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
 180 185 190

Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
 195 200 205

Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
 210 215 220

Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
 225 230 235 240

Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
 245 250 255

Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
 260 265 270

Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
 275 280 285

Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly

ES 2 744 267 T3

290						295										300
Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp	
305					310					315					320	
Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly	
				325					330					335		
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro	
			340					345					350			
Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp	
		355					360					365				
Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala	
	370					375					380					
Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu	
385					390					395					400	
Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln	
				405					410				415			
Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	
			420					425					430			
Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro	
		435					440					445				
Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys	
	450					455					460					
Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser	
465					470					475					480	
Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr	
				485					490					495		
Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe	
		500						505					510			
Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro	
		515					520					525				
Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu	
	530					535					540					
Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	
545					550					555					560	
Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys	
				565					570					575		
Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys	
		580						585					590			
Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln	
		595					600					605				
Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg	
	610					615					620					
Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	

ES 2 744 267 T3

625					630					635					640
Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Pro	Glu	Cys	Arg	Ile	Ser
				645					650					655	
Ala	Ile	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ser	Met	Tyr	Gln	Ser	Val	Cys	Leu	Ile
			660					665					670		
Ser	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Val	Ile	Ala	Thr	Glu	Val	***		
		675					680					685			

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de doble diana que se dirige a VEGFR-2 y DLL4 que comprende un antagonista de DLL4, el cual está unido a un terminal de un anticuerpo que se une a VEGFR-2,
 5 en el que el anticuerpo que se une a VEGFR-2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4 a 6, en el que el antagonista de DLL4 es el 11° y 12° dominio tipo EGF de unión a calcio de Notch1 humano, y en el que el antagonista de DLL4 está unido al N-terminal de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo que se une a VEGFR-2.
- 10 2. El anticuerpo de doble diana según la reivindicación 1, en el que el antagonista de DLL4 está unido al anticuerpo de unión a VEGFR-2 por el conector de aminoácido.
3. El anticuerpo de doble diana según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo que se une a VEGFR-2 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 4;
 15 una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 5; o una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 6.
- 20 4. El anticuerpo de doble diana según la reivindicación 1, en el que el antagonista de DLL4 es el 11° y 12° dominio tipo EGF de unión a calcio de Notch1 humano comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 7.
5. El ADN que codifica el anticuerpo de doble diana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector de expresión recombinante que comprende ADN según la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora transformada con el vector recombinante según la reivindicación 6.
8. Un procedimiento de producción de un anticuerpo de doble diana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 7 y aislar el anticuerpo de doble diana del cultivo.
- 25 9. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis que comprende el anticuerpo de doble diana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las enfermedades relacionadas con la angiogénesis es una o más seleccionadas del grupo que consiste en crecimiento tumoral, metástasis tumoral, degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), retinopatía diabética, psoriasis, artritis reumatoide e inflamación crónica.
- 30 10. La composición para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis según la reivindicación 9, en la que el tumor es uno o más seleccionados del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer bronquial, cáncer nasofaríngeo, cáncer de laringe, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de cuello de útero, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de huesos, el cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer paratiroideo, cáncer de riñón, cáncer esofágico, cáncer de conductos biliares, cáncer de testículos, cáncer rectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de uréter, osteosarcoma, neurocitoma, melanoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, astrocitoma, neuroblastoma y neuroglioma.

40

FIG. 1

DVDEC SLGAN PCEHA GKCIN
 TLGSF ECQCL QGYTG PRCEI
 DVNEC VSNPC QNDAT CLDQI
 GEFQC ICMPG YEGVH CE

FIG. 2

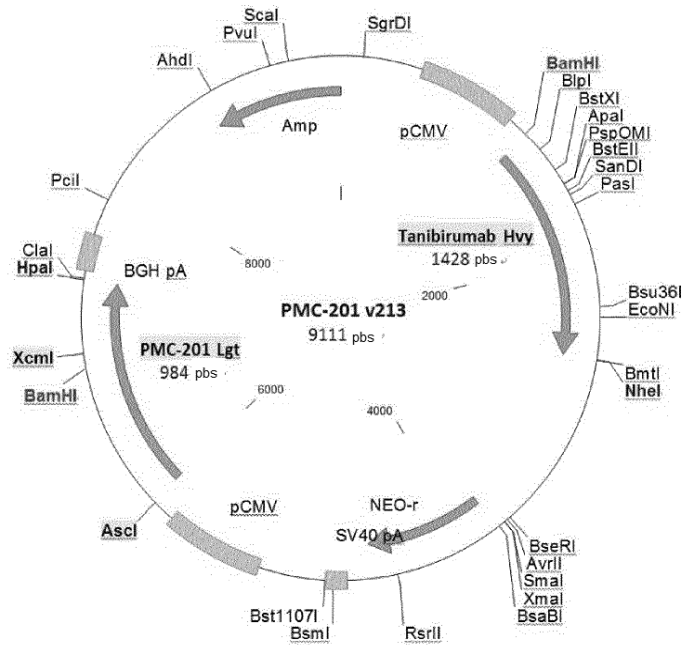


FIG. 3

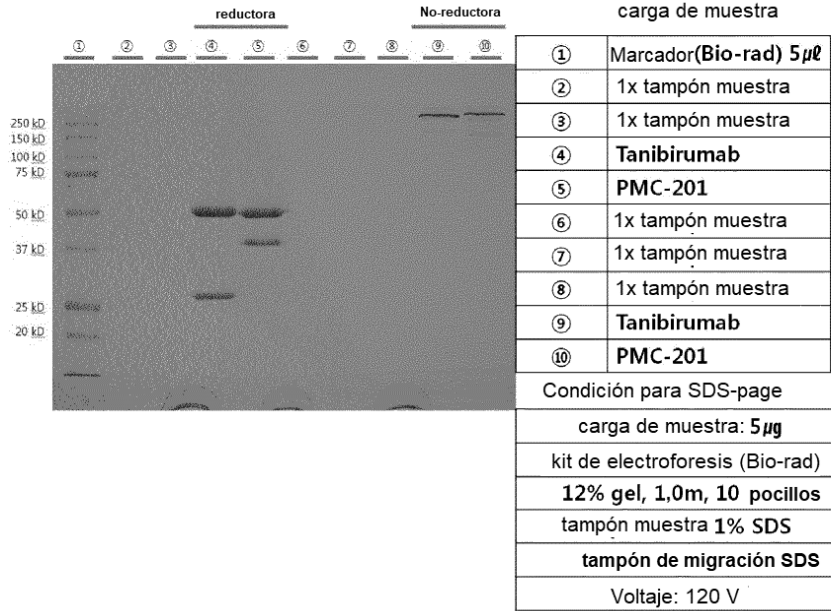


FIG. 4

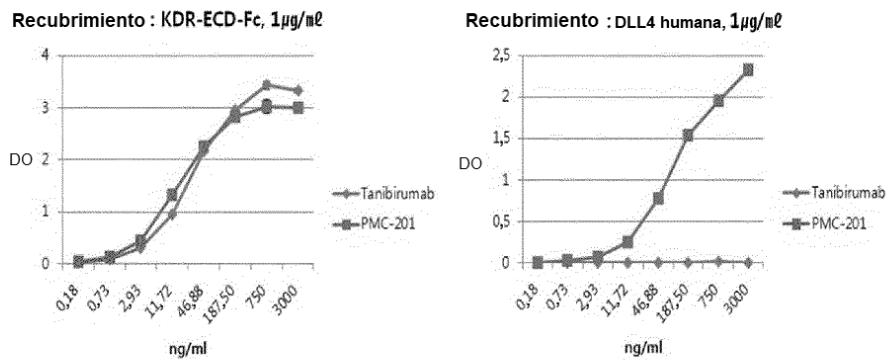


FIG. 5

Afinidad de unión de PMC-201 a Ag-X humana (Biacore)

	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD (M)
PMC-201	2,74 X10 ⁴	3,88 X10 ⁻⁴	1,42 X10 ⁻⁸
Notch1-Fc humano	6,09 X10 ⁴	1,22 X10 ⁻³	1,99 X10 ⁻⁸

FIG. 6

Célula: 293 que sobreexpresa DLL4 (conjunto)

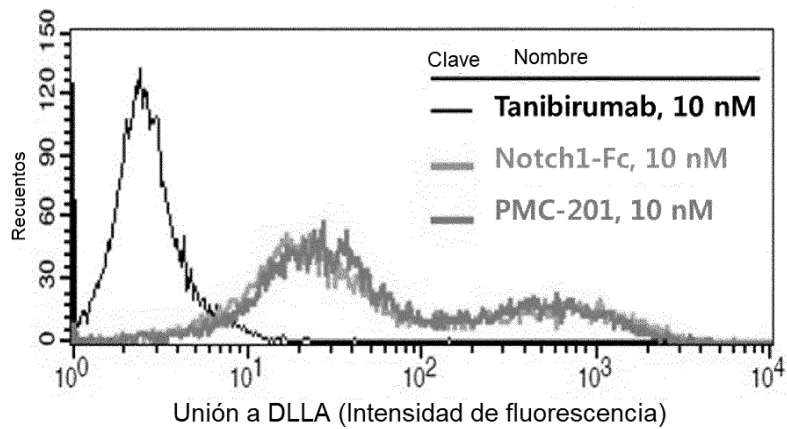


FIG. 7

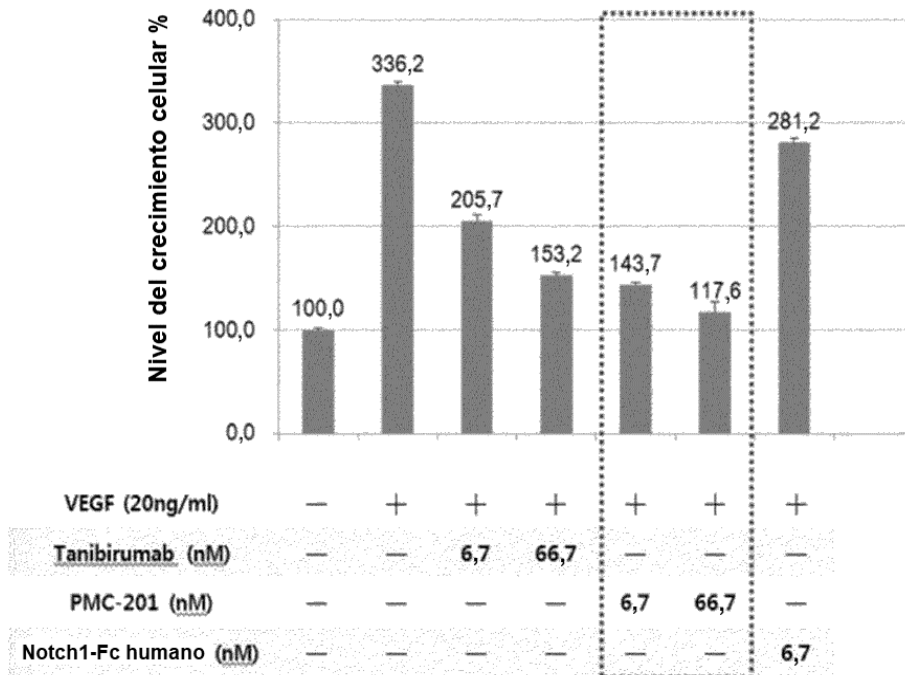
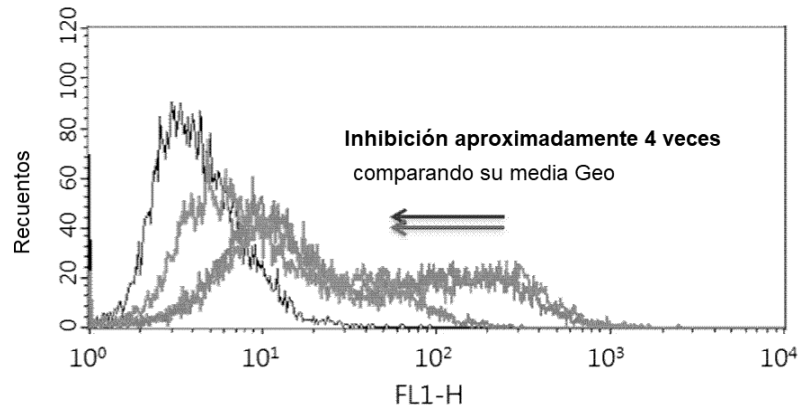


FIG. 8



	—	—	—	—
hNotch-Fc-FITC (1 µg/ml)	-	+	+	+
Media Geo	4,18	31,57	26,50	9,73
Competición Abs (16 µg/ml)	-	-	Tanibiru mab	PMC- 201

FIG. 9

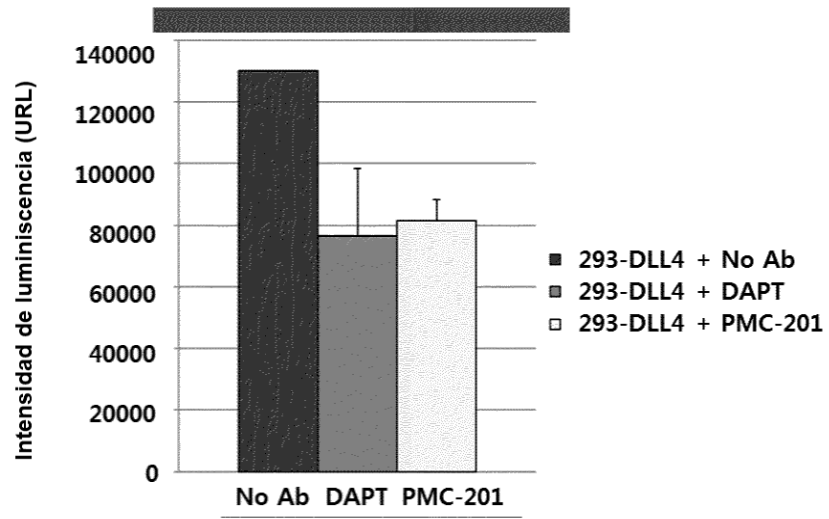


FIG. 10

