



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 775**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02745238 .2**
96 Fecha de presentación : **18.04.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1381384**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2004**

54 Título: **Politerapia utilizando agentes antiangiogénicos y TNF α .**

30 Prioridad: **24.04.2001 EP 01109981**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2011

73 Titular/es: **MERCK PATENT GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

72 Inventor/es: **Grell, Matthias;**
Goodman, Simon y
Ruegg, Curzio

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 366 775 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

Politerapia utilizando agentes antiangiogénicos y TNF α

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION:

5 La invención se refiere a una politerapia para el tratamiento de tumores y metástasis tumorales que comprende la administración de agentes antiangiogénicos y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o una molécula que tiene la actividad biológica del TNF α opcionalmente junto con otros agentes citotóxicos, como interferón gamma (IFN γ) o agentes quimioterapéuticos, como cisplatino, o inhibidores del receptor ErbB, como anticuerpos anti-EGFR. El método y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos agentes pueden tener como resultado una
10 potenciación sinérgica del efecto de inhibición de la proliferación de células tumorales de cada uno de los agentes terapéuticos individuales, proporcionando un tratamiento más eficaz que el que se obtendría con la administración de un único componente individual.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

15 La angiogénesis, también denominada neovascularización, es un proceso de vascularización tisular que supone el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que se desarrollan dentro de un tejido. El proceso está mediado por la infiltración de células endoteliales y células de músculo liso. Se considera que el proceso avanza por cualquiera de estas tres vías: 1) Los vasos pueden brotar a partir de vasos preexistentes, 2) el desarrollo *de novo* de vasos puede surgir de células precursoras (vasculogénesis) o 3) pequeños vasos existentes pueden aumentar de diámetro (Blood y col., 1990, *Bioch. Biophys. Acta* 1032, 89). Se sabe que las células del endotelio vascular contienen al menos cinco integrinas dependientes de RGD, que incluyen el receptor de la vitronectina ($\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$), el receptor de colágeno de tipo I y IV, el receptor de laminina, el receptor de fibronectina/laminina/colágeno y el receptor de fibronectina (Davis y col., 1993, *J. Cell. Biochem.* 51, 206). Se sabe que las células del músculo liso contienen al menos seis integrinas dependientes de RGD, que incluyen $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

25 La angiogénesis es un proceso importante en el crecimiento neonatal, aunque también es importante en la curación de heridas y en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades de importancia clínica, como la inflamación tisular, la artritis, la psoriasis, el cáncer, la retinopatía diabética, la degeneración macular y otras enfermedades oculares neovasculares. Estas entidades clínicas asociadas con la angiogénesis se denominan enfermedades angiogénicas (Folkman y col., 1987, *Science* 235, 442).

30 La inhibición de la adhesión celular *in vitro* usando anticuerpos monoclonales inmunoespecíficos para diversas subunidades α o β de las integrinas ha implicado al receptor $\alpha_v\beta_3$ de la vitronectina en la adhesión celular de diversos tipos celulares incluyendo células endoteliales microvasculares (Davis y col., 1993, *J. Cell. Biol.* 51, 206).

35 Las integrinas son una clase de receptores celulares conocidos por unirse a las proteínas de la matriz extracelular y, por tanto, mediar en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, denominadas generalmente acontecimientos de adhesión celular. Los receptores integrina constituyen una familia de proteínas que comparten características estructurales de complejos de glucoproteínas heterodiméricas no covalentes formadas por subunidades α y β . El receptor de la vitronectina, así denominado por su característica original de unión preferente a la vitronectina, ahora se sabe que hace referencia a tres integrinas diferentes designadas $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ que se unen a fibronectina y vitronectina. La integrina $\alpha_v\beta_3$ se une a una gran variedad de ligandos, entre ellos fibrina, fibrinógeno, laminina, trombospondina, vitronectina y factor de von Villebrand. La integrina $\alpha_v\beta_5$ se une a vitronectina. Está claro que existen diferentes integrinas con diferentes funciones biológicas, así como diferentes integrinas y subunidades que comparten especificidad biológica. Un sitio de reconocimiento importante en un ligando para muchas integrinas es la secuencia tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). RGD se encuentra en todos los ligandos identificados anteriormente para las integrinas receptores de vitronectina.

45 Este sitio de reconocimiento RGD puede ser mimetizado por (poli)péptidos lineales y cíclicos que contienen la secuencia RGD. Estos péptidos RGD son conocidos como inhibidores o antagonistas, respectivamente, de la función integrina. Es importante destacar, sin embargo, que dependiendo de la secuencia y estructura del péptido RGD, la especificidad de la inhibición puede verse alterada para dirigirse a integrinas específicas. Se han descrito diversos polipéptidos RGD de especificidad integrina variable, por ejemplo, en Cheresh y col., 1989, *Cell* 58, 945 y Aumailley y col., 1991, *FEBS Letts.* 291, 50 y en numerosas solicitudes de patentes y patentes (p. ej., patentes de EE. UU. 4.517.686, 4.578.079, 4.589.881, 4.614.517, 4.661.111 y 4.792.525; y documento EP 0770 622).

50 La generación de nuevos vasos sanguíneos, o angiogénesis, tiene una función importante en el crecimiento de enfermedades malignas y ha generado mucho interés en el desarrollo de fármacos que inhiben la angiogénesis (véase, por ejemplo, Holmgren y col., 1995, *Nature Medicine* 1, 149; Folkman, 1995, *Nature Medicine* 1, 27; O'Reilly y col., 1994, *Cell* 79, 315). El uso de antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ para inhibir la angiogénesis es conocido en métodos para inhibir el crecimiento de tumores sólidos reduciendo el aporte de sangre al tumor sólido

(véase, por ejemplo, los documentos US 5.753.230 y US 5.766.591, en los que se describe el uso de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$, como polipéptidos sintéticos, anticuerpos monoclonales y miméticos de $\alpha_v\beta_3$ que se unen al receptor $\alpha_v\beta_3$ e inhiben la angiogénesis). Los métodos y composiciones para inhibir la angiogénesis de tejidos mediada por $\alpha_v\beta_5$ usando antagonistas del receptor de vitronectina $\alpha_v\beta_5$ se describen en el documento WO 97/45447.

5 La angiogénesis se caracteriza por la invasión, migración y proliferación de células endoteliales, procesos que dependen de las interacciones celulares con componentes de la matriz extracelular. En este contexto, los receptores integrina célula-matriz median en la difusión y migración celular. Se ha demostrado que los receptores integrina $\alpha_v\beta_3$ de adhesión endotelial tienen una función clave proporcionando una diana vascular específica para las estrategias de tratamiento antiangiogénico (Brooks y col., 1994, *Science* 264, 569; Friedlander y col., 1995, *Science* 270).
 10 El requisito de la integrina $\alpha_v\beta_3$ vascular en la angiogénesis se ha demostrado en diversos modelos *in vivo* en los que la generación de nuevos vasos sanguíneos por tumores humanos trasplantados eran inhibida por completo mediante la administración sistémica de antagonistas peptídicos de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ como se indicó anteriormente o, alternativamente, por el anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$, LM609 (Brooks y col., 1994, *Cell* 79, 1157; ATCC HB 9537). Este anticuerpo bloquea el receptor integrina $\alpha_v\beta_3$, cuya activación por sus ligandos naturales inhibe la
 15 apoptosis de las células vasculares proliferativas angiogénicas interrumpiendo así la maduración de los vasos sanguíneos recién formados, un acontecimiento esencial para la proliferación de los tumores. Sin embargo, se ha publicado recientemente que las células de melanoma podrían formar patrones de vasos sanguíneos similares a una red incluso en ausencia de células endoteliales (Barinaga, 1999, *Science* 285, 1475), lo que supone que los tumores podrían ser capaces de sortear determinados fármacos antiangiogénicos que son sólo eficaces en presencia de tejido endotelial.
 20

Muchas moléculas estimulan la proliferación, migración y ensamblaje endotelial, como VEGF, Ang1 o bFGF, y son factores de supervivencia vitales. El VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) se ha identificado como un factor de crecimiento angiogénico selectivo que puede estimular la mitogénesis de las células endoteliales. Se considera que el VEGF, en particular, es un mediador importante de la angiogénesis en un tumor primario y en enfermedades oculares isquémicas. El VEGF es un homodímero (PM: 46.000) que es un factor angiogénico específico de células endoteliales (Ferrara y col., 1992, *Endocrin. Rev.*, 13, 18) y vasopermeable (Senger y col., 1986, *Cancer Res.*, 46:5629) que se une a receptores unidos a membrana de alta afinidad con actividad tirosina cinasa (Jakeman y col., 1992, *J. Clin. Invest.*, 89, 244). Las biopsias de tumores humanos muestran un aumento de la expresión de los ARNm del VEGF en las células malignas y de los ARNm del receptor de VEGF en células endoteliales adyacentes. La expresión de VEGF parece ser mayor en regiones de tumores adyacentes a áreas vasculares de necrosis (para una revisión véase Thomas y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271 (2), 603; Folkman, 1995, *Nature Medicine* 1, 27). En el documento WO 97/45447 se ha implicado a la integrina $\alpha_v\beta_5$ en la neovascularización, especialmente la que es inducida por VEGF, EGF y TGF- α y se describe que un antagonista de $\alpha_v\beta_5$ puede inhibir la angiogénesis promovida por VEGF. También pueden utilizarse terapias antitumorales eficaces dirigidas hacia el receptor VEGF para la inhibición de la angiogénesis usando anticuerpos monoclonales (Witte y col., 1998, *Cancer Metastasis Rev.* 17(2), 155). El AcM DC-101 es conocido porque inhibe la angiogénesis de células tumorales.
 25
 30
 35

Las tirosina cinasas son una clase de enzimas que catalizan la transferencia del fosfato terminal de la adenosina trifosfato a restos tirosina de sustratos proteicos. Se considera que las tirosina cinasas, mediante la fosforilación del sustrato, desempeñan funciones críticas en la transducción de señales para muchas funciones celulares. Aunque
 40 aún no están claros los mecanismos exactos de la transducción de señales, se ha demostrado que las tirosina cinasas son importantes como factores que contribuyen a la proliferación celular, la carcinogénesis y la diferenciación celular.

Las tirosina cinasas pueden clasificarse como tipo receptor o tipo no receptor. Tanto las tirosina cinasas de tipo receptor como las de tipo no receptor están implicadas en las rutas de señalización celular que conducen a numerosas situaciones patológicas, como el cáncer, la psoriasis y las respuestas hiperinmunológicas. Muchas tirosina cinasas están implicadas en el crecimiento celular, así como en la angiogénesis.
 45

Las tirosina cinasas de tipo receptor tienen una porción extracelular, una transmembrana y otra intracelular, mientras que las tirosina cinasas de tipo no receptor son completamente intracelulares. Las tirosina cinasas de tipo receptor son proteínas transmembrana que contienen un dominio de unión al ligando extracelular, una secuencia transmembrana y un dominio tirosina cinasa citoplásmico. Las tirosina cinasas de tipo receptor están compuestas por un gran número de receptores transmembrana con actividad biológica diversa. De hecho, se han identificado subfamilias diferentes de tirosina cinasas de tipo receptor. Entre las tirosina cinasas implicadas se incluyen los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de la principal familia de ErbB y los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
 50 También están implicados los receptores del factor de crecimiento nervioso (NGF), los receptores del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), los receptores de la neurotrofina-3 (NT-3) y los receptores de la neurotrofina-4 (NT-4).
 55

Una subfamilia de tirosina cinasas de tipo receptor, denominada subfamilia HER o ErbB, está compuesta por EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2 o p185neu), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2). Entre los ligandos de esta subfamilia de

receptores se incluyen el factor de crecimiento epitelial (EGF), TGF- α , anfirregulina, HB-EGF, betacelulina y herregulina. En la subfamilia PDGF se incluye la familia FLK que está compuesta por el receptor con dominio inserto cinasa (KDR).

5 El EGFR, codificado por el gen *erbB1*, se ha implicado causalmente en la neoplasia maligna humana. En particular, se ha observado un aumento de la expresión de EGFR en cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, así como en glioblastomas. El aumento de la expresión del receptor de EGFR se asocia a menudo con el aumento de la producción del ligando EGFR, el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por las mismas células tumorales, lo que tiene como resultado la activación del receptor mediante una vía de estimulación autocrina (Baselga y Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)). El receptor de EGF es una glicoproteína transmembrana que tiene un peso molecular de 170.000 y se encuentra en muchos tipos de células epiteliales. Se activa al menos por tres ligandos, EGF, TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa) y anfirregulina. Se ha demostrado que tanto el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) se unen al receptor de EGF e inducen la proliferación celular y el crecimiento tumoral. Estos factores de crecimiento no se unen a HER2 (Ulrich y Schlesinger, 1990, *Cell* 91, 203). Al contrario que varias familias de factores de crecimiento, que inducen la dimerización del receptor en virtud de su naturaleza dimérica (p. ej., PDGF), los factores de crecimiento monomérico, como el EGF, contienen dos sitios de unión para sus receptores y, por tanto, pueden entrecruzar dos receptores de EGF vecinos (Lemmon y col., 1997, *EMBO J.* 16, 281). La dimerización del receptor es esencial para la estimulación de la actividad catalítica intrínseca y para la autofosforilación de los receptores de factores de crecimiento. Debe destacarse que los receptores proteína tirosina cinasa (PTK) son capaces de sufrir tanto homo como heterodimerización.

Se ha demostrado que los anticuerpos anti-receptor EGF al tiempo que bloquean la unión de EGF y TGF- α al receptor pueden inhibir la proliferación de las células tumorales. A la vista de estos resultados, se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales murinos y de rata frente al receptor de EGF en los que se ha comprobado su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo* (Modjtahedi y Dean, 1994, *J. Oncology* 4, 277). El anticuerpo monoclonal humanizado 425 (AcMh 425, documentos US 5.558.864 y EP 0531 472) y el anticuerpo monoclonal quimérico 225 (AcMc 225, documentos US 4.943.533 y EP 0359 282), dirigidos ambos frente al receptor de EGF, han mostrado su eficacia en ensayos clínicos. Se ha demostrado que el anticuerpo C225 inhibe *in vitro* el crecimiento de células tumorales mediado por EGF e inhibe *in vivo* la formación de tumores humanos en ratones desnudos. Además, parece que el anticuerpo actúa, sobre todo, en sinergia con determinados agentes quimioterapéuticos (es decir, doxorrubicina, adriamicina, taxol y cisplatino) para erradicar los tumores humanos *in vivo* en modelos de xenotrasplante en ratones. Ye y col. (1999, *Oncogene* 18, 731) han publicado que las células de cáncer de ovario humano pueden tratarse de forma eficaz con una combinación de AcMc 225 y AcM 4D5 humanizado, dirigido frente al receptor HER2.

El segundo miembro de la familia ErbB, HER2 (ErbB2 o p185 neu) fue identificado originalmente como el producto del gen transformante de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del protooncogén *neu* es el resultado de una mutación puntual (de valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en cánceres de mama y de ovario y se correlaciona con un mal pronóstico (Slamon y col., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon y col., *Science*, 244:707-712 (1989); documento US 4.968.603). ErbB2 (HER2) tiene un peso molecular de aproximadamente 185.000, con una homología considerable con el receptor de EGF (HER1), aunque hasta el momento no se ha identificado con claridad un ligando específico para HER2.

El anticuerpo 4D5 dirigido frente al receptor HER2, se encontró además que sensibiliza a las líneas celulares de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB2 frente a los efectos citotóxicos de TNF α (documento US 5.677.171). Una versión humanizada recombinante del anticuerpo anti-ErbB2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 o HERCEPTIN®; documento US 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2, las cuales habían recibido tratamiento antineoplásico previo (Baselga y col., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 (1996)). HERCEPTIN® recibió la aprobación de comercialización en 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína ErbB2.

El TNF α pertenece a una familia grande de moléculas que incluyen citocinas importantes como el ligando Fas, el ligando CD40, TRAIL, linfotóxina y otros (Locksley y col., 2001, *Cell* 104:487-501). Además de ser liberado por muchos tipos de células, el TNF α también se encuentra sobre las células en una forma de mayor peso molecular unido a la membrana celular y parece que esta forma también media en diversos efectos biológicos. Se piensa que el TNF α tiene una escasa función en el desarrollo y la fisiología normales; sin embargo, ejerce efectos nocivos y destructivos sobre muchos tejidos en muchos estados patológicos (Tracey y col., *Ann. Rev. Med.* 1994; 45:491). Entre los estados patológicos en los que se ha demostrado que el TNF α ejerce un papel principal se incluyen el síndrome de choque séptico, la caquexia cancerosa, la artritis reumatoide, etc.

El TNF α humano se purificó por primera vez en 1985 (véase Aggarwal y col., *J Biol. Chem.* 1985, 260, 2345-2354). Poco después, se consiguió la clonación molecular del ADNc del TNF y la clonación del locus del TNF humano

(Pennica y col., *Nature* 1984, 312, 124-729; Wang y col., *Nature* 1985, 313, 803-806). El TNF α es un polipéptido trimérico de 17 kDa producido principalmente por los macrófagos. Este péptido se expresa inicialmente como una proteína transmembrana de 26 kDa a partir de la cual se escinde la subunidad de 17 kDa y se libera por escisión proteolítica. Normalmente, el TNF α es producido por diversas células: por ejemplo, macrófagos y fibroblastos activados. Se ha publicado que el TNF α induce gran número de factores diversos. También se ha publicado que el TNF α participa, directa o indirectamente, en diversas enfermedades, como enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis, SIDA, septicemia y determinados tipos de infecciones.

El TNF α y la infección con respuesta inflamatoria, así como la lesión tisular inducen una cascada de cambios bioquímicos que desencadenan el inicio de reacciones desconcertantes del sistema inmunitario, denominadas colectivamente respuesta inflamatoria. La evolución de esta respuesta se basa, al menos en parte, en la vasodilatación local o en el aumento de la permeabilidad vascular y en la activación del endotelio vascular, que permite que los leucocitos circulen con eficacia y migren al sitio dañado, aumentando de este modo sus oportunidades de unirse y destruir cualquier antígeno. Se piensa que entonces el endotelio vascular está activado o inflamado. Generalmente, la inflamación es una respuesta inmunitaria bien acogida ante una variedad de estímulos inesperados y, como tal, muestra un inicio rápido y corta duración (inflamación aguda). Sin embargo, su actividad persistente o incontrolada (inflamación crónica) tiene efectos perjudiciales para el organismo y da lugar a la patogénesis de varias enfermedades inmunitarias, como: choque séptico, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias intestinales e insuficiencia cardíaca congestiva (véase "TNF and TNF receptor superfamily" en "Cytokines and cytokine receptors", Bona y Revillard (Eds.), Harvard Academic Publishers, Ámsterdam 2000, páginas 118-148).

El TNF α , así como muchas otras citocinas, son secretados por macrófagos poco después del inicio de la respuesta inflamatoria e inducen la coagulación, aumentan la permeabilidad vascular y activan la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio vascular.

El TNF α no es completamente beneficioso ni completamente destructivo para el hospedador.

Por tanto, el TNF α es un potente modulador de la función de las células endoteliales. Dependiendo del contexto vascular, promueve la inflamación induciendo la activación y supervivencia de las células endoteliales y causa necrosis tisular induciendo la apoptosis de las célula endotelial y alteración vascular (Pober, J. S., *Pathol Biol* (Paris) 46, 159-163 (1998); Aggarwal y Natarajan, *Eur. Cytokine Netw.* 7, 93-124 (1996)). Se han caracterizado muchas vías de señalización intracelulares que median en estas dos respuestas divergentes (Wallach y col., *Annual Review of Immunology* 17, 331-367 (1999)), pero las señales extracelulares que determinan si las células endoteliales expuestas al TNF α sobrevivirán o morirán siguen siendo difíciles de localizar.

Antes bien, se mantiene el equilibrio de su producción y regulación para garantizar que el hospedador pueda reaccionar de forma eficaz a los microorganismos invasores sin comprometer el bienestar del hospedador en el proceso. Siendo un mediador de inflamación, el TNF α ayuda al organismo en su lucha contra las infecciones bacterianas y en las lesiones tisulares estimulando una respuesta inmunitaria apropiada. Sin embargo, su sobreproducción induce una inflamación crónica, tiene efectos perjudiciales sobre el organismo y tiene una función principal en la patogénesis de varias enfermedades.

El IFN γ es un potente activador del TNF α (Dealtry y col., *Eur J. Immunol* 17, 689-693, (1987)). En el caso en que el TNF α provoca la apoptosis celular, la activación de NF- κ B, un factor de transcripción que promueve la supervivencia celular, puede suprimir la apoptosis inducida por TNF α (Van Antwerp y col., *Science* 274, 787-789 (1996)).

El TNF α induce una amplia variedad de señales celulares que inducen respuestas celulares como proliferación, activación, diferenciación y también muerte celular programada. La señalización celular al TNF α puede clasificarse en respuestas tempranas, como activación de cinasas, fosfatasa, lipasas, proteasas y factores de transcripción, y respuestas tardías y, por tanto, respuestas más indirectas, como perturbación de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria, producción de radicales, producción de óxido y la liberación de sustancias diversas. Muchas de las respuestas celulares tempranas, como el reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen dominios de muerte, la activación del NF- κ B o la activación de caspasas, se inician también mediante la unión de otros miembros de la familia del ligando TNF a sus respectivos receptores. Por consiguiente, moléculas como la linfotóxina, el ligando Fas o TRAIL pueden actuar de forma redundante con TNF (Grell y Clauss, *l.c.*).

La adhesión a la matriz extracelular (MEC) mediada por integrinas es esencial para la supervivencia de la mayoría de las células, incluyendo las células endoteliales. Por ejemplo, la integrina vascular α ν β β promueve la proliferación y supervivencia de las células endoteliales angiogénicas y los antagonistas de α ν β β inducen la apoptosis de la célula endotelial angiogénica y suprimen la angiogénesis (Brooks y col., *Cell* 79, 1157-1164 (1994)). Se han identificado varios de los acontecimientos bioquímicos asociados con la supervivencia celular mediada por integrinas, incluyendo la activación de las vías de señalización de PI 3-K/AKT (Khwaja y col., *Embo Journal* 16, 2783-2793 (1997)) y NF- κ B (Scatena y col., *J Cell Biol* 141,1083-1093 (1998)). Además de las integrinas, las moléculas de

adhesión entre células PECAM-1 y VE-cadherina también promueven la supervivencia de la célula endotelial (Bird y col. *J Cell Sci* 112,1989-1997 (1999); Carmeliet y col. *Cell*, 98, 147-157 (1999)).

5 El TNF es citotóxico para algunas de las líneas celulares tumorales aunque el crecimiento de la mayoría de ellas prácticamente no se ve afectado. Por tanto, es poco probable que los efectos antitumorales del TNF en algunos modelos animales (Balkwill y col., *Cancer Res.* 46: 3990-3993 (1986)) sean debidos a la acción directa de la citocina sobre las células tumorales. En varios estudios se ha visto que los mecanismos mediados por el hospedador están implicados en la regresión tumoral desencadenada por el TNF (Manda y col., *Cancer Res.* 47: 3707-3711 (1987)). Los datos acumulados indican que la necrosis hemorrágica de los tumores por el TNF se inicia a nivel de las células endoteliales de los vasos intratumorales (Havell y col., *J. Exp. Med.* 167: 1967-1985 (1988)).

10 Los resultados de los estudios clínicos sobre el TNF en pacientes con cáncer son, en general, decepcionantes (revisado en Haranaka, *J. Biol. Response Mod.* 7: 525-534 (1988)). En general, los efectos antitumorales del TNF están limitados por sus efectos adversos considerables. Una estrategia para limitar los efectos adversos del TNF ha sido la generación de mutantes del TNF que muestran las actividades específicas del receptor del TNF de tipo 1 o propiedades farmacodinámicas diferentes (Brouckaert y col., *Circ. Shock* 43: 185-190 (1994); Eggermont, *Anti-cancer Res.* 18: 3899-3905 (1998); Lucas y col., *Int. J. Cancer* 15: 543-549 (2001)). Recientemente se han obtenido progresos en pacientes afectados por melanomas o sarcomas de las extremidades. Podrían obtenerse efectos beneficiosos significativos mediante la técnica de perfusión aislada. Se han usado dosis extremas de TNF de hasta 4 mg en combinación con citostáticos o IFN (Lienard y col., *J. Clin. Oncol.* 10: 52-60 (1992)). Entre las respuestas locales se incluyen reblandecimiento y enrojecimiento agudos del tumor asociados con una fuerte respuesta inflamatoria, similares a los efectos antitumorales mediados por TNF en sistemas murinos.

20 También se ha observado que este tratamiento en pacientes con melanoma metastásico de las extremidades interrumpe de forma selectiva la vasculatura del tumor, pero deja intactos los vasos en reposo. Este efecto se asocia con la supresión inducida por TNF e IFN γ de la función integrina $\alpha_v\beta_3$ en células endoteliales *in vitro* y la inducción de apoptosis *in vivo* en células endoteliales (Ruegg y col., *Nature Med* 4, 408-414 (1998)). Estos resultados demuestran que el TNF, en combinación con agentes terapéuticos adicionales, puede ser clínicamente muy eficaz en el tratamiento de algunos tumores, siempre que pueda controlarse la toxicidad sistémica.

25 En la presente invención se describe ahora que las moléculas que contribuyen a la angiogénesis, como las integrinas, pueden tener, a la vez que modulan la actividad del TNF α , implicaciones directas en el uso clínico del TNF α como agente antineoplásico. La administración conjunta de agentes antiangiogénicos con TNF α , preferiblemente antagonistas de integrinas, puede sensibilizar de forma selectiva a las células endoteliales portadoras de receptores de angiogénesis a la actividad apoptótica del TNF dando lugar a una mejora en la alteración de los vasos del tumor. Por tanto, esta politerapia puede facilitar la reducción de las dosis de TNF evitando los efectos adversos sistémicos del TNF.

RESUMEN DE LA INVENCION

35 La presente invención describe por primera vez el nuevo concepto en el tratamiento tumoral de administrar a un individuo un agente que bloquea o inhibe la angiogénesis junto con TNF α , mutantes de TNF y moléculas similares a TNF. Opcionalmente, la composición según esta invención comprende adicionalmente compuestos terapéuticamente activos, seleccionados preferiblemente entre el grupo compuesto por agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos e inhibidores o antagonistas de la familia del receptor tirosina cinasa ErbB, como se describe a continuación con más detalle.

40 Por tanto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y TNF α opcionalmente junto con IFN γ . La composición preferida según la invención comprende el péptido cíclico ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), TNF α e IFN γ . Según esta invención dichos agentes terapéuticamente activos pueden también proporcionarse mediante un kit farmacéutico que comprende un envase con dicho agente antiangiogénico TNF α y, opcionalmente, uno o más agentes citotóxicos / quimioterapéuticos / agentes anti-ErbB en envases únicos o en recipientes independientes.

45 La invención se refiere, más específicamente, a una politerapia que comprende la aplicación y administración, respectivamente, de dos o más moléculas, en la que el ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) tiene actividad inhibidora de la angiogénesis y la otra molécula es TNF α . Sin embargo, la invención se refiere, además, a una politerapia que comprende la administración de solo una molécula (fusión), que tiene actividad antiangiogénica y actividad TNF α , opcionalmente junto con uno o más agentes citotóxicos/quimioterapéuticos. Por ejemplo, puede aplicarse al paciente una proteína de fusión compuesta esencialmente por ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) fusionado directamente o a través de una molécula enlazadora al TNF α .

55 Principalmente, la administración puede ir acompañada de radioterapia, donde el tratamiento de radiación puede hacerse sustancialmente de forma simultánea, o antes o después de la administración del fármaco. La administra-

ción de los diferentes agentes de la politerapia según la invención también puede lograrse sustancialmente de forma simultánea o secuencial. Los tumores portadores de receptores en sus superficies celulares implicados en el desarrollo de los vasos sanguíneos del tumor, pueden tratarse de forma eficaz mediante la politerapia de esta invención.

5 Se sabe que los tumores muestran vías alternativas para su desarrollo y crecimiento. Si una vía está bloqueada, a menudo, tienen la capacidad de cambiar a otra vía expresando y usando otros receptores y vías de señalización. Por tanto, las combinaciones farmacéuticas de la presente invención pueden bloquear varias de estas posibles estrategias de desarrollo del tumor y proporcionar en consecuencia diversos beneficios. Las combinaciones según la presente invención son útiles para tratar y prevenir tumores, trastornos similares a tumores y neoplasias y metástasis tumorales que se describen con más detalle a continuación. Preferiblemente, los diferentes agentes combinados de la presente invención se administran en combinación a una dosis baja, es decir, a dosis más bajas que las utilizadas convencionalmente en situaciones clínicas. Entre los beneficios de reducir la dosis de los compuestos, composiciones, agentes y terapias de la presente invención administrada a un individuo se incluyen una disminución en la incidencia de efectos adversos asociados con dosis más altas. Por ejemplo, reduciendo la dosis de un agente quimioterapéutico como el metotrexato, se observará una reducción en la frecuencia y en la intensidad de náuseas y vómitos en comparación con las observadas a dosis más altas. Reduciendo la incidencia de efectos adversos, se contempla una mejora en la calidad de vida del paciente con cáncer. Entre los beneficios adicionales de reducir la incidencia de efectos adversos se incluyen una mejora en el cumplimiento por parte del paciente, una reducción en el número de hospitalizaciones necesarias para el tratamiento de los efectos adversos y una reducción en la administración de agentes analgésicos necesarios para tratar el dolor asociado con los efectos adversos. Alternativamente, los métodos y la combinación de la presente invención también pueden maximizar el efecto terapéutico a dosis más altas.

Las combinaciones según las invenciones muestran un efecto sinérgico asombroso. Administrando la combinación de fármacos, podía observarse la retracción y desintegración real del tumor durante los estudios clínicos, mientras que no se detectaban reacciones adversas significativas al fármaco.

La invención en detalle se refiere a:

- una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos i) ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) como agente antiangiogénico y ii) factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o una molécula que tiene la actividad biológica del TNF α opcionalmente junto con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- una composición farmacéutica correspondiente, en la que dicho agente antiangiogénico y el TNF α están unidos entre sí para formar una molécula de fusión;
- una composición farmacéutica correspondiente, que además comprende al menos un agente citotóxico y/o quimioterapéutico;
- una composición farmacéutica correspondiente, en la que dicho agente citotóxico es interferón gamma (IFN γ) y/u otra citocina eficaz;
- una composición farmacéutica correspondiente, en la que dicho compuesto quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por: cisplatino, doxorrubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel (taxol) y bleomicina;
- una composición farmacéutica correspondiente, que además comprende un inhibidor o antagonista de la familia de receptores tirosina cinasa ErbB;
- una composición farmacéutica correspondiente, en la que dicho inhibidor es un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento inmunoterapéuticamente activo de los mismos;
- un kit farmacéutico que comprende un envase que contiene i) ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), preferiblemente un inhibidor/antagonista del receptor integrina, ii) TNF α y, opcionalmente, iii) un agente citotóxico y/o quimioterapéutico adicional;
- un kit farmacéutico correspondiente preferido que comprende i) ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), ii) TNF α y iii) IFN γ y, opcionalmente, iii) un agente citotóxico y/o quimioterapéutico adicional y/o un inhibidor o antagonistas de la familia de receptores tirosina cinasa ErbB;
- un kit farmacéutico correspondiente, en el que dichos agentes farmacéuticamente activos se proporcionan en recipientes independientes en dicho envase;

- el uso de dicha composición farmacéuticas como se define anteriormente y en las reivindicaciones, para la producción de un medicamento o una composición de medicamentos para tratar tumores y metástasis tumorales; y
- que puede usarse en un método para tratar tumores o metástasis tumorales en un individuo que comprende la administración simultánea o secuencialmente a dicho individuo de una composición farmacéutica terapéuticamente eficaz como se define anteriormente;

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Si no se indica otra cosa, los términos y frases utilizadas en esta invención tienen los significados y definiciones que se proporcionan a continuación. Además, estas definiciones y significados describen la invención con más detalle, incluyendo las realizaciones preferidas.

- 10 El término "**moléculas biológicas**" incluye moléculas naturales o sintéticas que tienen, por norma, un peso molecular mayor de aproximadamente 300 y son, preferiblemente, poli y oligosacáridos, oligo y polipéptidos, proteínas, péptidos, poli y oligonucleótidos así como sus derivados lipídicos glucosilados. Más normalmente, entre las moléculas biológicas se incluyen agentes inmunoterapéuticos, sobretodo anticuerpos o fragmentos de los mismos, o derivados funcionales de estos anticuerpos o fragmentos incluyendo proteínas de fusión.
- 15 Un "**receptor**" o "**molécula receptora**" es una proteína o glucoproteína soluble o unida/asociada a la membrana que comprende uno o más dominios a los que se une el ligando para formar un complejo receptor-ligando. Al unirse el ligando, que puede ser un agonista o un antagonista, el receptor se activa o inactiva y puede iniciar o bloquear una ruta de señalización.
- 20 Por "**ligando**" o "**ligando del receptor**" se entiende un compuesto natural o sintético que se une a una molécula receptora para formar un complejo receptor-ligando. El término ligando incluye agonistas, antagonistas y compuestos con acción agonista/antagonista parcial. Según el campo específico de esta invención, el término incluye, sobre todo, ligandos similares a TNF.
- 25 El término "**TNF α** " según se usa en este documento, incluye, si no está específicamente restringido, todo tipo de moléculas de TNF y moléculas que tienen la actividad biológica del TNF α , incluyendo mutantes de TNF peptídicos o no peptídicos, naturales o sintéticos, variantes o ligandos similares a TNF. Preferiblemente, el término significa TNF α peptídico natural.
- Un "**agonista**" o "**agonista del receptor**" es un compuesto natural o sintético que se une al receptor para formar un complejo receptor-agonista activando dicho receptor y complejo receptor-antagonista, respectivamente, iniciando una vía de señalización y procesos biológicos adicionales.
- 30 Por "**antagonista**" o "**antagonista del receptor**" se entiende un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico opuesto al de un agonista. Un antagonista se une al receptor y bloquea la acción de un agonista del receptor compitiendo con el agonista por el receptor. Un antagonista se define por su capacidad para bloquear las acciones de un agonista. Un antagonista del receptor puede ser también un anticuerpo o un fragmento inmunoterapéuticamente eficaz del mismo. Los antagonistas preferidos según la presente invención se citan y discuten más adelante.
- 35 El término "**terapéuticamente eficaz**" o "**cantidad terapéuticamente eficaz**" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas, reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y, preferiblemente, detener) la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos, inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y, preferiblemente detener) la metástasis tumoral, inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociación con el cáncer. Dependiendo del grado al que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar a las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En el caso del tratamiento contra el cáncer, la eficacia puede determinarse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TPE) y/o determinando la tasa de respuesta (TR).
- 40
- 45 La expresión "**inmunoterapéuticamente eficaz**" se refiere a moléculas biológicas que inducen una respuesta inmunitaria en un mamífero. Más específicamente, el término se refiere a moléculas que pueden reconocer y unirse a un antígeno. Generalmente, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos que comprenden sus sitios de unión al antígeno (regiones determinantes de complementariedad, CDR) son inmunoterapéuticamente eficaces.
- 50

El término "**profármaco**" según se usa en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco original y es capaz de activarse o convertirse enzimáticamente en la forma original más activa (véase, p. ej., "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)).

5 Un "**agente antiangiogénico**" se refiere a un compuesto natural o sintético que bloquea o interfiere, hasta cierto punto, en el desarrollo de vasos sanguíneos. La molécula antiangiogénica puede, por ejemplo, ser una molécula biológica que se une y bloquea un factor de crecimiento angiogénico o un receptor del factor de crecimiento. La molécula antiangiogénica preferida en este documento se une a un receptor, preferiblemente a un receptor de integrina o a un receptor de VEGF. Según la invención, el término también incluye un profármaco de dicho agente angiogénico.
10

Existen un gran número de moléculas que tienen una estructura y origen diferentes que muestran propiedades antiangiogénicas. Las clases más relevantes de agentes inhibidores o bloqueantes de la angiogénesis adecuados para esta invención son, por ejemplo:

- (i) antimitóticos como fluorouracilo, mitomicina C o taxol;
- 15 (ii) metabolitos de estrógenos como 2-metoxiestradiol;
- (iii) inhibidores de metaloproteinasas de la matriz (MMP), que inhiben las metaloproteinasas de cinc (metaloproteasas) (p.ej., betimastat, BB16, TIMP, minociclina, GM6001 o los descritos en " Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Applications" (Golub, *Annals of the New York Academy of Science*, Vol. 878a; Greenwald, Zucker (Eds.), 1999);
- 20 (iv) agentes y factores antiangiogénicos multifuncionales como IFN γ (documentos US 4.530.901, US 4.503.035, 5.231.176); fragmentos de angiostatina y plasminógeno (p. ej. kringle 1-4, kringle 5, kringle 1-3 (O'Reilly, M. S. y col., *Cell (Cambridge, Mass.)* 79(2) 315-328, 1994; Cao y col., *J. Biol. Chem.* 271: 29461 -29467, 1996; Cao y col., *J. Biol Chem* 272: 22924-22928, 1997); endostatina (O'Reilly, M. S. y col., *Cell* 88(2), 277, 1997 y el documento WO 97/15666), trombospondina (TSP-1; Frazier, 1991, *Curr Opin Cell Biol* 3(5): 792) o factor de plaquetas 4 (PF4);
- 25 (v) inhibidores del activador de plasminógeno/urocinasa;
- (vi) antagonistas del receptor de la urocinasa;
- (vii) heparinasas;
- (viii) análogos de fumaquilina, como TNP-470;
- 30 (ix) los inhibidores de la tirosina cinasa como SUI 01 (muchos de los antagonistas del receptor ErbB mencionados anterior y posteriormente (antagonistas de EGFR / HER2) también son inhibidores de tirosina cinasas y pueden mostrar, por tanto, actividad bloqueante del receptor de EGF, lo que produce una inhibición del crecimiento del tumor, así como una actividad antiangiogénica que da lugar a la inhibición del desarrollo de los vasos sanguíneos y de las células endoteliales, respectivamente).
- 35 (x) suramina y análogos de suramina;
- (xi) esteroides angiostáticos;
- (xii) antagonistas de VEGF y bFGF;
- (xiii) antagonistas del receptor de VEGF como anticuerpos anti-receptor de VEGF (DC-101);
- (xiv) antagonistas de flk-1 yflt-1;
- 40 (xv) inhibidores de la ciclooxigenasa II, como COX-II;
- (xvi) antagonistas de integrinas y antagonistas de receptores integrina como antagonistas de α_v y antagonistas del receptor α_v , por ejemplo, anticuerpos anti-receptor α_v y péptidos RGD. Según esta invención, se prefieren antagonistas de (receptores) integrinas.

La expresión “**antagonistas/inhibidores de integrinas**” o “**antagonistas/inhibidores del receptor integrina**” se refiere a una molécula natural o sintética que bloquea e inhibe un receptor integrina. En algunos casos, la expresión incluye antagonistas dirigidos frente a los ligandos de dichos receptores integrinas (p. ej., para $\alpha_v\beta_3$: vitronectina, fibrina, fibrinógeno, factor de von Willebrand, trombospondina o laminina; para $\alpha_v\beta_5$: vitronectina; para $\alpha_v\beta_1$: fibronectina y vitronectina; para $\alpha_v\beta_6$: fibronectina).

Según la invención, se prefieren antagonistas dirigidos frente a los receptores integrinas. Los antagonistas de (receptores) integrinas pueden ser péptidos naturales o sintéticos, moléculas no peptídicas, peptidomiméticas, inmunoglobulinas, como anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, o inmunoconjugados (proteínas de fusión).

Los inhibidores de integrinas preferidas de la invención están dirigidos frente al receptor integrinas α_v (p. ej., $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ y subclases). Los inhibidores de integrinas preferidos son antagonistas de α_v y, en particular, antagonistas de $\alpha_v\beta_3$. Según la invención, los antagonistas de α_v preferidos son péptidos RGD, antagonistas peptidomiméticos (no péptidos) y anticuerpos anti-receptor integrina, como anticuerpos que bloquean receptores α_v .

Como ejemplo, se describen antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ no inmunológicos en las explicaciones de los documentos US 5.753.230 y US 5.766.591. Los antagonistas preferidos son péptidos lineales y cíclicos que contienen RGD. Los péptidos cíclicos, por norma, son más estables y muestran una semivida en suero potenciada. Sin embargo, el antagonista de integrinas más preferido de la invención es el ciclo(Arg-Gly-Asp-DpHe-NMeVal) (EMD 121974, Cilengitide[®], Merck KGaA, Alemania; documento EP 0770 622) que bloquea de forma eficaz los receptores integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$ y $\alpha_{11b}\beta_3$.

Se han descrito antagonistas peptídico adecuados, así como peptidomiméticos (no péptidos) de los receptores integrina $\alpha_v\beta_3$ / $\alpha_v\beta_5$ / $\alpha_v\beta_6$ tanto en la literatura científica como de patentes. Por ejemplo, puede hacerse referencia a Hoekstra y Poulter, 1998, Curr. Med. Chem. 5, 195; documentos WO 95/32710, WO 95/37655, WO 97/01540, WO 97/37655, WO 97/45137, WO 97/41844, WO 98/08840, WO 98/18460, WO 98/18461, WO 98/25892, WO 98/31359, WO 98/30542, WO 99/15506, WO 99/15507, WO 99/31061, WO 00/06169, EP 0853 084, EP 0854 140, EP 0854 145, US 5.780.426 y US 6.048.861. Entre las patentes en las que se describe la benzacepina, así como antagonistas del receptor integrina $\alpha_v\beta_3$ relacionados con benzodiazepinas y benzocicloheptano, que son también adecuados para su uso en esta invención, se incluyen WO 96/00574, WO 96/00730, WO 96/06087, WO 96/26190, WO 97/24119, WO 97/24122, WO 97/24124, WO 98/15278, WO 99/05107, WO 99/06049, WO 99/15170, WO 99/15178, WO 97/34865, WO 97/01540, WO 98/30542, WO 99/11626 y WO 99/15508. Otros antagonistas del receptor integrina que se caracterizan por una conformación principal limitada a un anillo se han descrito en los documentos WO 98/08840; WO 99/30709; WO 99/30713; WO 99/31099; WO 00/09503; US 5.919.792; US 5.925.655; US 5.981.546 y US 6.017.926. En los documentos US 6.048.861 y WO 00/72801 se describía una serie de derivados de ácido no aniónico que son potentes antagonistas del receptor integrina $\alpha_v\beta_3$. Otras moléculas químicas pequeñas antagonistas de integrina (principalmente antagonistas de vitronectina) se describen en el documento WO 00/38665. Otros antagonistas del receptor $\alpha_v\beta_3$ han mostrado ser eficaces en la inhibición de la angiogénesis. Por ejemplo, se han probado antagonistas de receptor sintéticos como el ácido (S)-10,11-dihidro-3-[3-(piridin-2-ilamino)-1-propiloxi]-5H-dibenzo[a,d]ciclohepten-10-acético (conocido como SB-265123) en diversos sistemas de modelos de mamíferos (Keenan y col., 1998, Bioorg. Med. Chem. Lett. 8(22), 3171; Ward y col., 1999, Drug Metab. Dispos. 27(11),1232). Los ensayos para la identificación de antagonistas de integrinas adecuados para su uso como antagonistas se describen, p. ej., en Smith y col., 1990, J. Biol. Chem. 265, 12267, y la bibliografía de la patente referenciada.

También se conocen anticuerpos frente al receptor integrina. Los anticuerpos monoclonales frente a integrinas (p. ej., $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$) adecuados puede modificarse para abarcar fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluyendo F(ab)₂, Fab y Fv o anticuerpo de cadena sencilla obtenidos por ingeniería genética. Un anticuerpo monoclonal adecuado y utilizado preferiblemente dirigido frente al receptor integrina $\alpha_v\beta_3$ se identifica como LM609 (Brooks y col., 1994, Cell 79, 1157; ATCC HB 9537). Un potente anticuerpo específico anti- $\alpha_v\beta_5$, P1F6, se describe en el documento WO 97/45447, que también es preferido según esta invención. Un anticuerpo adicional adecuado selectivo de $\alpha_v\beta_6$ es el AcM 14D9.F8 (documento WO 99/37683, DSM ACC2331, Merck KGaA, Alemania) así como el AcM 17.E6 (documento EP 0719 859, DSM ACC 2160, Merck KGaA) que se dirigen selectivamente frente a la cadena α_v de los receptores integrina. Otro anticuerpo anti-integrina adecuado es el comercializado Vitraxin[®].

Un “**factor de crecimiento angiogénico o receptor de factor de crecimiento**” es un factor o receptor que promueve mediante su activación el crecimiento y desarrollo de los vasos sanguíneos. Típicamente, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor pertenecen a este grupo.

El término “**anticuerpo**” o “**inmunoglobulina**” se usa en este documento en el sentido más amplio y abarca específicamente a anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. El término generalmente incluye heteroanticuerpos que están

compuestos por dos o más anticuerpos o fragmentos de los mismos de especificidad de unión diferente los cuales están unidos entre sí.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de sus regiones constantes, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes **“clases de anticuerpos (inmunoglobulinas)”**. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y algunos de estas pueden dividirse adicionalmente en “subclases” (isotipos), p. ej. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La clase principal preferida de anticuerpos según la invención es IgG, más concretamente, IgG1 e IgG2.

10 Los anticuerpos son generalmente glucoproteínas que tienen un peso molecular de aproximadamente 150.000 compuestas por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, aunque el número de puentes disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se considera que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

15 El término **“anticuerpo monoclonal”** según se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden presentarse en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único sitio antigénico. Además, al contrario que las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a determinantes (epítopes) diferentes, cada anticuerpo monoclonal está dirigido frente a un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación de otros anticuerpos. Entre los métodos para la obtención de anticuerpos monoclonales se incluyen el método de obtención de hibridomas descrito por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256, 495) y en “Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas” (1985, Burdon y col., Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volumen 13, Elsevier Science Publishers, Ámsterdam) o pueden obtenerse mediante métodos de ADN recombinante bien conocidos (véase, p. ej., el documento US 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991), por ejemplo.

25 El término **“anticuerpo quimérico”** significa anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de estos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (p. ej., documento US 4.816.567; Morrison y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los métodos para obtener anticuerpos quiméricos y humanizados son también conocidos en la técnica. Por ejemplo, entre los métodos para obtener anticuerpos quiméricos se incluyen los descritos en las patentes de Boss (Celltech) y Cabilly (Genentech) (documentos US 4.816.397 y US 4.816.567).

45 Los **“anticuerpos humanizados”** son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (p. ej., de roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región hipervariable (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas circunstancias, los restos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes.

55 Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para obtener un anticuerpo más refinado. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y generalmente dos, dominios variables completos, en los que todos, o sustancialmente todos, los lazos hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todos, o sustancialmente todos, los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de la inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la obten-

ción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en Winter (documento US 5.225.539) y Boss (Celltech, documento US 4.816.397).

El término “**variable**” o “**FR**” se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables de ambas cadenas ligeras y pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada una cuatro FR (FR1- FR4), que adoptan en gran parte una configuración β laminar, conectada mediante tres regiones hipervariables, que forman lazos conectados, y en algunos casos formando parte de la estructura β laminar. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas y próximas gracias a los FR y, junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, aunque muestran diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El término “**región hipervariable**” o “**CDR**” cuando se usa en este documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno.

Generalmente, la región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (p. ej., restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada y/o aquellos restos de un “lazo hipervariable” (p. ej., restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

La “**región estructural**” o restos “**FR**” son aquellos restos del dominio variable distintos a los de la región hipervariable según se define en este documento.

Los “**fragmentos de anticuerpo**” comprenden una porción de un anticuerpo intacto que, preferiblemente, comprende la región de unión al antígeno o la región variable de la misma. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y Fc, anticuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Un anticuerpo “intacto” es aquel que comprende una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada CH1, CH2 y CH3. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos denominados fragmentos “**Fab**”, que comprenden cada “**Fc**” residual, cuyo nombre reflejan su capacidad para cristalizar fácilmente.

La región “**Fc**” de los anticuerpos comprende, por norma, CH2, CH3 y la región bisagra de una clase principal de anticuerpo IgG1 o IgG2. La región bisagra es un grupo de aproximadamente 15 restos de aminoácidos que unen la región CH1 con la región CH2-CH3.

El tratamiento con pepsina produce un fragmento “**F(ab')₂**” que tiene dos sitios de unión al antígeno y es capaz de entrecruzar al antígeno. “**Fv**” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno completo. Esta región consta de un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Está en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero VH – VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo. El fragmento **Fab** también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos “**Fab**” difieren de los fragmentos Fab en la adición de algunos restos al extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas de la bisagra entre ellos. También se conocen otros métodos de conjugación química de fragmentos de anticuerpo (véase, p. ej., Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 1996; documento US 4.342.566).

Los fragmentos de anticuerpo "**Fv de cadena sencilla**" o "**scFv**" comprenden los dominios V y V del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan como una cadena polipeptídica sencilla. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permiten al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Se conocen anticuerpos Fv de cadena sencilla, por ejemplo, de Plückerthun (5 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994)), documentos WO93/16185, US 5.571.894, US 5.587.458; Huston y col. (1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5879) o de Skerra y Plueckthun (1988, *Science* 240, 1038).

El término "**dianticuerpos**" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio pesado variable (V) conectado con un dominio ligero variable (V) en la misma cadena polipeptídica (V - V). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para que se apareen los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los dianticuerpos se describen en mayor detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097 y WO 93/11161.

Los "**anticuerpos biespecíficos**" son anticuerpos divalentes sencillos (o fragmentos inmunoterapéuticamente eficaces de los mismos) que tienen dos sitios de unión al antígeno con especificidad diferente. Por ejemplo, el primer sitio de unión al antígeno se dirige a un receptor de angiogénesis (p. ej., integrina o receptor de VEGF), mientras que el segundo sitio de unión al antígeno se dirige a un receptor ErbB (p. ej., EGFR o HER2). Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante técnicas químicas (véase, p. ej., Kranzky y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5807), mediante técnicas de "polidoma" (véase el documento US 4.474.893) o mediante técnicas de ADN recombinante, que son todas conocidas *per se*. En los documentos WO 91/00360, WO 92/05793 y WO 96/04305 se describen métodos adicionales. Los anticuerpos biespecíficos también pueden prepararse a partir de anticuerpos de cadena sencilla (véase, p. ej., Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5879; Skerra y Plueckthun (1988) *Science* 240, 1038). Estos son análogos de regiones variables de anticuerpo producidas como una cadena polipeptídica sencilla. Para formar el agente de unión biespecífico, los anticuerpos de cadena sencilla pueden unirse químicamente o mediante métodos de ingeniería genética conocidos en la técnica. También es posible obtener anticuerpos biespecíficos según esta invención usando secuencias cremallera de leucina. Las secuencias empleadas derivan de las regiones cremallera de leucina de los factores de transcripción Fos y Jun (Landschulz y col., 1988, *Science* 240, 1759; para una revisión, véase Maniatis y Abel, 1989, *Nature* 341, 24). Las cremalleras de leucina son secuencias de aminoácidos específicas con una longitud de aproximadamente 20-40 restos con una leucina normalmente cada siete restos. Estas secuencias cremallera forman hélices α anfipáticas, con los restos de leucina alineados sobre el lado hidrófobo para la formación de dímeros. Los péptidos que se corresponden con las cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun forman preferentemente heterodímeros (O'Shea y col., 1989, *Science* 245, 646). Los anticuerpos biespecíficos que contienen secuencias cremallera y métodos para su obtención también se describen en los documentos WO 92/10209 y WO 93/11162. Un anticuerpo biespecífico según la invención puede ser un anticuerpo dirigido frente al receptor de VEGF y el receptor $\alpha_V\beta_3$ como se describió anteriormente con respecto a los anticuerpos que tienen especificidad única.

El término "**inmunoconjugado**" se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina, respectivamente, o un fragmento inmunológicamente eficaz del mismo, que se fusiona mediante un enlace covalente con una molécula no inmunológicamente eficaz. Preferiblemente, esta pareja de fusión es un péptido o una proteína, que puede estar glucosilada. Dicha molécula no anticuerpo puede unirse al extremo C-terminal de las cadenas pesadas constantes del anticuerpo o a los extremos N terminales de las cadenas ligera y/o pesada variables. Las parejas de fusión pueden unirse a través de una molécula enlazadora, que es, por norma, un péptido que contiene de 3 a 15 restos de aminoácidos. Los inmunoconjugados según la invención comprenden preferiblemente proteínas de fusión compuestas por una inmunoglobulina, o un fragmento inmunoterapéuticamente eficaz de la misma, dirigida frente a un receptor angiogénico, preferiblemente un receptor integrina o del VEGF y TNF α , o una proteína de fusión compuesta esencialmente por TNF α e IFN γ u otra citocina adecuada, que está unida con su extremo N-terminal al extremo C-terminal de dicha inmunoglobulina, preferiblemente la porción Fc de la misma.

El término "**proteína de fusión**" se refiere a una molécula natural o sintética compuesta de uno o más proteínas o péptidos no inmunoterapéuticamente eficaces (no anticuerpo) que tienen especificidad diferente, los cuales se fusionan opcionalmente mediante una molécula enlazadora. Las proteínas de fusión según la invención pueden ser moléculas compuestas, por ejemplo, por ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) fusionada con TNF α y/o IFN γ .

Los "**heteroanticuerpos**" son dos o más anticuerpos o fragmentos de unión de anticuerpos que se unen, teniendo cada uno de ellos una especificidad de unión diferente. Los heteroanticuerpos pueden prepararse conjugando dos o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Los heteroanticuerpos preferidos están compuestos de fragmentos Fab/Fab' entrecruzados. Pueden usarse diversos agentes de conjugación o entrecruzamiento para conjugar los anticuerpos. Son ejemplos la proteína A, carboimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA) y N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (véase, p. ej., Karpovsky y col. (1984) *J. Exp. Med.* 160, 1686; Liu y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8648). Entre otros métodos se incluyen los descritos por Paulus, Behring Inst. Mitt., N $^{\circ}$ 78, 118 (1985); Brennan y col. (1985) *Science* 30 m:81 o Glennie y col. (1987) *J. Immunol.* 139, 2367. En otro

método se utiliza o-fenilendimaleimida (oPDM) para conjugar tres fragmentos Fab' (documento WO 91/03493). También son adecuados en el contexto de esta invención los anticuerpos multiespecíficos y pueden prepararse, por ejemplo, según las explicaciones del documento WO 94/13804 y WO 98/50431.

5 Las "**funciones efectoras**" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia variable) de un anticuerpo. Entre los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo se incluyen citotoxicidad dependiente del complemento, unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis, regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (p. ej. receptor de la célula B), etc.

10 El término "**ADCC**" (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (p. ej., células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y, posteriormente, causa la lisis de la célula diana. Las células principales que median en la ADCC, las células NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, como el descrito en la técnica previa (documentos US 15 5.500.362 y US 5.821.337). Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK).

20 Las "**células efectoras humanas**" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizar funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en la actividad ADCC se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos.

25 Los términos "**receptor de Fc**" o "**FcR**" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y, alternativamente, formas de ajuste de estos receptores. Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991).

30 El término "**citocina**" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otras células como mediadores intercelulares. Son ejemplos de estas citocinas las linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimientos, como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metionilo y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorrelaxina, hormonas glucoproteínas como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, péptido asociado con gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), integrina, trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nerviosos como NGFβ, factor de crecimiento de plaquetas, factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGFα y TGFβ, eritropoyetina (EPO), interferones como IFNα, IFNβ e IFNγ, factores estimulantes de colonias como M-CSF, GM-CSF y G-CSF, interleucinas como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; y TNFα o TNFβ. Las citocinas preferidas según la invención son interferones y TNFα.

40 El término "**agente citotóxico**" según se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos y toxinas, como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas. El término puede incluir también miembros de la familia de citocinas, preferiblemente IFNγ.

45 El término "**agente quimioterapéutico**" o "**agente antineoplásico**" incluye agentes químicos que ejercen efectos antineoplásicos, es decir, previenen el desarrollo, la maduración o la propagación de células neoplásicas, directamente sobre la célula tumoral, p. ej., mediante efectos citostáticos o citotóxicos y no indirectamente a través de mecanismos como la modificación de la respuesta biológica. Los agentes quimioterapéuticos adecuados según la invención son preferiblemente compuestos químicos naturales o sintéticos, aunque moléculas biológicas, como proteínas, polipéptidos, etc., no están expresamente excluidas. Existe un gran número de agentes antineoplásicos disponible en el uso comercial, en evaluación clínica y en desarrollo preclínico, que podría incluirse en la presente invención para el tratamiento de tumores/neoplasias mediante politerapia con TNFα y los agentes antiangiogénicos como los citados anteriormente, opcionalmente con otros agentes como antagonistas del receptor de EGF. Debe destacarse que los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse opcionalmente junto con la combinación de fármacos indicada anteriormente.

55 Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas nitrogenada, compuestos de etilenimina, sulfonatos de alquilo y otros compuestos con acción alquilante, como nitro-

5 soureas, cisplatino y dacarbazina; antimetabolitos, por ejemplo, ácido fólico, antagonistas de purina o pirimidina; inhibidores mitóticos, por ejemplo, alcaloides de la vinca y derivados de podofilotoxina, antibióticos citotóxicos y derivados de camptotecina. Entre los agentes quimioterapéuticos o quimioterapia preferidos se incluyen amifostina (etiol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estrepto-zocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina liposomal (doxil), gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, daunorrubicina liposomal (daunoxoma), procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotero), aldesleucina, asparraginas, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolido, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromán, plicamicina, estrepto-zocina, tamoxifén, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo y combinaciones de los mismos.

Los agentes quimioterapéuticos más preferidos según la invención son cisplatino, gemcitamina, doxorubicina, paclitaxel (taxol) y bleomicina.

15 Los términos “**cáncer**” y “**tumor**” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Mediante las composiciones farmacéuticas según la presente invención, los tumores pueden tratarse como tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello del útero e hígado. Más específicamente, el tumor se selecciona entre el grupo compuesto por adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hamartoma, heman-gioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma y teratoma. En detalle, el tumor se selecciona entre el grupo compuesto por melanoma lentiginoso acral, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma cístico adenoide, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de bartolino, carcinoma basocelular, carcinomas glandulares bronquiales, capilar, carcinoide, carcinoma, carcinosarcoma, cavernoso, colangiocarcinoma, condrosarcoma, papiloma/carcinoma del plexo coroideo, carcinoma de células claras, cistadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometrioide, ependimal, epitelioide, sarcoma de Ewing, fibrolamelar, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de células germinales, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, hepatoadenoma, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulino-ma, neoplasia intraepitelial, neoplasia interepitelial de células escamosas, carcinoma invasivo de células escamosas, carcinoma de células grandes, leiomyosarcoma, melanomas lentigo malignos, melanoma maligno, tumores mesoteliales malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, meníngeo, mesotelial, carcinoma metastásico, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, carcinoma de célula en avena, oligodendrogial, osteosarcoma, polipéptido pancreático, adenocarcinoma papilar seroso, pineal, tumores de la pituitaria, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma microcítico, carcinomas de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, submesotelial, melanoma superficial diseminante, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrucoso, vipoma, carcinoma bien diferenciado y tumor de Wilm.

Un “**receptor ErbB**” es un receptor proteína tirosina cinasa que pertenece a la familia de receptores ErbB e incluye receptores EGFR(ErbB1), ErbB2, ErbB3 y ErbB4 y otros miembros de esta familia que se identifiquen en el futuro. El receptor ErbB comprenderán generalmente un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando ErbB, un dominio transmembrana lipófilo, un dominio tirosina cinasa intracelular conservado y un dominio de señalización carboxilo terminal portador de varios restos de tirosina que pueden fosforilarse. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB de “secuencia nativa” o una “variante de la secuencia de aminoácidos” de la misma. Preferiblemente, el receptor ErbB es un receptor ErbB humano de secuencia nativa. ErbB1 se refiere al gen que codifica el producto de la proteína EGFR. Lo más preferible es el receptor de EGF (HER1). Las expresiones “ErbB1” y “HER1” se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a la proteína HER1 humana. Los términos “ErbB2” y “HER2” se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a la proteína HER2 humana. Se prefieren los receptores ErbB1 (EGFR) según esta invención

El “**ligando de ErbB**” es un polipéptido que se une y/o activa un receptor ErbB. Entre los ligandos de ErbB que se une a EGFR se incluyen EGF, TGF- α , amfirregulina, betacelulina, HB-EGF y epirregulina.

La expresión “**antagonista/inhibidor del receptor ErbB**” se refiere a una molécula natural o sintética que se une y bloquea o inhibe el receptor ErbB. Por tanto, bloqueando el receptor, el antagonista previene la unión del ligando ErbB (agonista) y la activación del complejo agonista/ligando del receptor. Los antagonistas de ErbB pueden dirigirse frente a HER1 (EGFR) o HER2. Los antagonistas preferidos de la invención se dirigen frente al receptor EGF (EGFR, HER1). El antagonista del receptor ErbB puede ser un anticuerpo o un fragmento inmunoterapéuticamente eficaz del mismo o moléculas no inmunológicas, como un péptido o proteína polipeptídica. También se incluyen moléculas químicas; no obstante, los anticuerpos anti-EGFR y los anticuerpos anti-HER2 son los antagonistas pre-

feridos según la invención. Los anticuerpos preferidos de la invención son anticuerpos anti-Her1 y anti-Her2, más preferiblemente los anticuerpos anti-Her1. Los anticuerpos anti-Her1 preferidos son el AcM 425, preferiblemente el AcM 425 humanizado (AcMh 425, documentos US 5.558.864 y EP 0531 472) y el AcM 225 quimérico (AcMc 225, documentos US 4.943.533 y EP 0359 282). El anticuerpo monoclonal más preferidos es el h425, que ha demostrado en monoterapia una alta eficacia combinado con efectos adversos y secundarios reducidos. El anticuerpo anti-HER2 más preferido es HERCEPTIN[®], comercializado por Genentech/Roche.

Los antagonistas del receptor EGF eficaces según la invención pueden ser también compuestos químicos naturales o sintéticos. Algunos ejemplos de moléculas preferidas de esta categoría son compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y organometálicos.

Ejemplos de antagonistas del receptor HER2 son: compuestos heteroarilo estilil sustituidos (documento US 5.656.655), compuestos heteroaril arilo bis mono y/o bicíclico, carbocíclico y heterocíclico (documento US 5.646.153), compuestos pirimidina tricíclicos (documento US 5.679.683), derivados de quinazolina que tiene actividad inhibidora de receptores tirosina cinasa (documento 5.616.582), compuestos heteroariletanodiilo o heteroariletanodiilarilo (documento US 5.196.446), un compuesto designado como 6-(2,6-diclorofenil)-2-(4-(2-dietil-amino-etoxi)fenilamino)-8-metil-8H-pirido(2,3)-5-pirimidin-7-ona (Panek, y col., 1997, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 283,1433) que inhibe las familias de receptores EGFR, PDGFR y FGFR.

“Radioterapia”: los tumores que pueden ser tratados con las composiciones farmacéuticas según la invención pueden tratarse adicionalmente con radiación o compuestos radiofarmacéuticos. La fuente de radiación puede ser externa o interna con respecto al paciente que está siendo tratado. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia es conocida como radioterapia de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Algunos átomos radiactivos típicos que se han utilizado son radio, cesio-137 e iridio-192, americio-241 y oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. También es posible marcar los agentes según la invención con isótopos radiactivos. Hoy en día, la radioterapia es el tratamiento convencional para controlar los tumores no extirpables o inoperables y/o metástasis tumorales. Se han observado mejores resultados cuando la radioterapia se combinaba con quimioterapia. La radioterapia se basa en el principio de que la radiación a dosis altas administrada a un área diana producirá la muerte de las células en reproducción tanto en tejidos tumorales como normales. La pauta posológica de radiación generalmente se define en términos de dosis de radiación absorbida (rad), tiempo y fraccionamiento y deber ser definido cuidadosamente por el oncólogo. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de diversa consideraciones, aunque las dos consideraciones más importantes son la localización del tumor en relación con otras estructuras u órganos críticos del organismo y el grado de extensión del tumor. Un ciclo de tratamiento preferido para un paciente sometido a radioterapia será una pauta de tratamiento durante un periodo de 5 a 6 semanas, con una dosis total de 50 a 60 Gy, administrada al paciente en fracciones únicas diarias de 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. Gy es la abreviatura de Gray y se refiera a una dosis de 100 rad. En la realización preferida, se observa sinergia cuando los tumores de pacientes humanos se tratan con el antagonista de la angiogénesis, TNF α /IFN γ y radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral mediante dichos compuestos se ve potenciada cuando se combinan con radiación y/o agentes quimioterapéuticos. La radioterapia puede utilizarse opcionalmente según la invención. Se recomienda y prefiere en los casos en que no pueden administrarse al paciente cantidades suficientes de los agentes según la invención.

“Tratamiento farmacéutico”: el método de la invención comprende diversas modalidades para la práctica de la invención en términos de las etapas. Por ejemplo, los agentes según la invención pueden administrarse simultáneamente, de forma secuencial o por separado. Adicionalmente, los agentes pueden administrarse por separado dentro de un intervalo de tiempo de aproximadamente 3 semanas entre administraciones, es decir, desde sustancialmente de forma inmediata después de la administración del primer agente activo hasta aproximadamente 3 semanas después de la administración del primer agente. El método puede practicarse después de un procedimiento quirúrgico. Alternativamente, el procedimiento quirúrgico puede practicarse durante el intervalo entre la administración del primer agente activo y el segundo agente activo. La combinación del método presente con la extirpación quirúrgica del tumor es un ejemplo de este método. El tratamiento según el método comprenderá generalmente la administración de las composiciones terapéuticas en uno o más ciclos de administración. Por ejemplo, cuando se practica una administración simultánea, se administra una composición terapéutico que comprende ambos agentes durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 días a aproximadamente 3 semanas en un único ciclo. Posteriormente, el ciclo de tratamiento puede repetirse si es necesario a juicio del médico. De forma similar, cuando se contempla una aplicación secuencial, se ajustará el tiempo de administración para cada tratamiento individual para cubrir normalmente el mismo periodo de tiempo. El intervalo entre ciclos puede variar de aproximadamente cero a 2 meses.

Los agentes de esta invención pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección o infusión gradual a lo largo del tiempo. Aunque, típicamente, puede accederse al tejido que se va a tratar en el organismo mediante administración sistémica y, por tanto, se trata con mayor frecuencia mediante administración intravenosa de las composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de administración en los que existe la probabilidad de que el tejido al que se dirige contenga la molécula diana. Por tanto, los agentes de esta invención pueden

administrarse por vía intraocular, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, trans-
 dérmica, mediante inyección ortotópica e infusión y también pueden administrarse por medios peristálticos. Las
 composiciones terapéuticas que contienen, por ejemplo, un antagonista de integrina de esta invención, se adminis-
 5 tran convencionalmente por vía intravenosa, como por ejemplo, mediante inyección de una dosis única. Las compo-
 siciones terapéuticas de la presente invención contienen un vehículo fisiológicamente tolerable junto con el agente
 relevante según se describe en este documento, disuelto o disperso en este como un principio activo. Según se usa
 en este documento, la expresión "**farmacéuticamente aceptable**" se refiere a composiciones, vehículos, diluyentes
 y reactivos que representan materiales capaces de su administración a o sobre un mamífero sin la producción de
 10 efectos fisiológicos no deseados, como náuseas, mareos, molestias gástricas y similares. La preparación de una
 composición farmacológica que contiene principios activos disueltos o dispersos en ella es bien conocida en la
 técnica y no es necesario limitarse en base a su formulación. Típicamente, estas composiciones se preparan como
 inyectables, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas; sin embargo, también pueden prepararse
 formas sólidas adecuadas para solución o suspensiones en líquido antes de su uso. La preparación también puede
 15 emulsionarse. El principio activo puede mezclarse con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables y com-
 patibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en
 este documento. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o
 similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades meno-
 res de sustancias auxiliares como agente humectantes o emulsionantes, agentes para tamponar el pH y similares
 que potencian la eficacia del principio activo. La composición terapéutica de la presente invención puede incluir
 20 sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de la misma. Entre las sales farmacéuticamente acepta-
 bles se incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con
 ácidos inorgánicos, como por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o como ácidos orgánicos como acético, tartá-
 rico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases
 inorgánicas, como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico y como bases orgánicas como
 25 isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares. Se prefiere especialmente la sal HCl
 cuando se usa en la preparación de polipéptidos cíclicos antagonistas de α_v . Los vehículos fisiológicamente tolera-
 bles son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no
 contienen materiales excepto los principios activos y agua, o contienen un tampón como fosfato sódico a una valor
 de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, como solución salina tamponada con fosfato. Aún más, los
 30 vehículos acuosos pueden contener más de una sal tampón, así como sales como cloruro de sodio y potasio, dex-
 troso, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además
 de o como exclusión del agua. Son ejemplos de estas fases líquidas adicionales glicerina, aceites vegetales como
 el aceite de semillas de algodón y emulsiones agua y aceite.

Normalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico, por ejemplo, en forma de
 35 anticuerpo o fragmento de anticuerpo o anticuerpo conjugado que bloquea el receptor integrina o un anticuerpo,
 fragmento o conjugado que bloquea el receptor de VEG es una cantidad que cuando se administra en una compo-
 sición fisiológicamente tolerable es suficiente para alcanzar una concentración plasmática de entre aproximada-
 mente 0,01 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aproxi-
 40 madamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y, normalmente, aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Establecidas de forma diferente, las dosis pueden
 variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente
 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente
 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias durante uno o varios días. Cuando el agente immuno-
 terapéutico está en forma de fragmento de un anticuerpo monoclonal o conjugado, la cantidad puede ajustarse
 45 fácilmente en función de la masa del fragmento/conjugado en relación con la masa del anticuerpo completo. Una
 concentración plasmática preferida en molaridad es de aproximadamente 2 micromolar (μM) a aproximadamente
 5 milimolar (mM) y, preferiblemente, de aproximadamente 100 μM a 1 mM del anticuerpo antagonista.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente según esta invención que es un péptido no inmunoterapéutico o
 un polipéptido proteico (p. ej., TNF α o IFN γ) u otra molécula biológica de tamaño similar, es típicamente una canti-
 50 dad de polipéptido de modo que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente
 para alcanzar una concentración en plasma de aproximadamente 0,1 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproxi-
 madamente 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En base a un
 polipéptido que tiene una masa de aproximadamente 50 gramos por mol, la concentración plasmática preferida en
 molaridad es de aproximadamente 2 micromolar (μM) a aproximadamente 5 milimolar (mM) y preferiblemente de
 aproximadamente 100 μM a 1 mM de polipéptido antagonista.

55 La dosis típica de un agente activo, que es preferiblemente un antagonista químico o un agente quimioterapéutico
 (químico) según la invención (ni agente inmunoterapéutico ni péptido/proteína no inmunoterapéutico) es de 10 mg a
 1.000 mg, preferiblemente de aproximadamente 20 a 200 mg y, más preferiblemente, de 50 a 100 mg por kilogramo
 de peso corporal y día.

60 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender fórmulas que abarcan el tratamiento de un
 sujeto con agentes que reducen o evitan los efectos secundarios asociados con la politerapia de la presente inven-
 ción ("terapia complementaria"), incluyendo, pero sin limitaciones, aquellos agentes que, por ejemplo, reducen el

efecto tóxico de los fármacos antineoplásicos, p. ej., inhibidores de la resorción ósea o agentes cardioprotectores. Dichos agentes auxiliares previenen o reducen la incidencia de náuseas y vómitos asociados con quimioterapia, radioterapia o intervención quirúrgica, o reducen la incidencia de infección asociada con la administración de fármacos antineoplásicos mielodepresores. Los agentes auxiliares son bien conocidos en la técnica.

- 5 Los agentes inmunoterapéuticos según la invención pueden administrarse adicionalmente con adyuvantes como BCG y estimuladores del sistema inmunitario. Adicionalmente, las composiciones pueden incluir agentes inmunoterapéuticos o agentes quimioterapéuticos que contienen isótopos marcados radioactivamente eficaces como citotóxicos u otros agentes citotóxicos, como péptidos citotóxicos (p. ej., citocinas) o fármacos citotóxicos o similares.
- 10 El término “**kit farmacéutico**” para tratar tumores o metástasis tumorales se refiere a un envase y, como norma, instrucciones de uso de los reactivos en métodos para tratar tumores y metástasis tumorales. Un reactivo de un kit de esta invención típicamente se formula como una composición terapéutica como se describe en este documento y, por tanto, puede estar en cualquiera de diversas formas adecuadas para su distribución en un kit. Estas formas pueden incluir un líquido, polvo, comprimido, suspensión y la formulación similar para proporcionar el antagonista y/o la proteína de fusión de la presente invención. Los reactivos pueden proporcionarse en recipientes independientes adecuados para su administración por separado según los métodos actuales o, alternativamente, pueden proporcionarse combinados en una composición es un único recipiente en el envase. El envase puede contener una cantidad suficiente para una o más dosis de reactivos según los métodos de tratamiento descritos en este documento. Un kit de esta invención también contiene “instrucciones de uso” de los materiales contenidos en el envase.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. La formación de esferoide y la supervivencia de las HUVEC no requieren la ligación de la integrina. **(a)** Un AcM bloqueante anti-VE-cadherina (75) o la depleción de Ca^{2+} (EDTA, EDTA/ Ca^{2+}) inhibían la formación de esferoides de HUVEC, mientras que los AcM bloqueantes anti-integrina α_1 (Lia1/2), α_5 (SAM-1), $\alpha_v\beta_3$ (LM609) y PECAM-1 (10D9) o un péptido RGD no lo hacían. **(b)** Viabilidad. Las HUVEC recuperadas de los cultivos de esferoides (○) o de fibronectina (●) tenían perfiles de viabilidad similares.

Figura 2. La adhesión dependiente de integrinas protege a las HUVEC de la apoptosis inducida por TNF. **(a)** Captación de YoPro-1: la exposición a TNF (T) y a TNF/ $IFN\gamma$ (TI) no inducía la tinción con YoPro-1 en las HUVEC adherentes a fibronectina, mientras que se producía una tinción intensa con YoPro-1 en los esferoides de HUVEC, que se suprimía con los inhibidores de caspasas BOC y ZVAD. TNF \pm $IFN\gamma$ (TI). C. cultivos sin tratar. **(b)** Demostración de la activación de la caspasa-3 y de la escisión de PARP (cabezas de flecha) mediante inmunotransferencia en esferoides tratados con TNF/ $IFN\gamma$ (TI), pero no en HUVEC adherentes a fibronectina. C, cultivos no tratados. **(c, d)** Curvas de viabilidad de HUVEC expuestas a TNF (■), TNF/ $IFN\gamma$ (▲) o medio control (○). **(e)** Viabilidad de las HUVEC cultivadas sobre anticuerpos inmovilizados (AcMi) dirigidos frente a las integrinas α_1 (Δ /▲), $\alpha_v\beta_3$ (□/■) y α_4 (○/●) en ausencia (símbolos vacíos) o presencia (símbolos rellenos) de TNF/ $IFN\gamma$.

Figura 3. La activación de NF- κ B inducida por TNF no requiere la ligación de la integrina. **(a)** La inmunotransferencia y **(b)** los ensayos de cambios en la movilidad electroforética (EMSA) muestran cinéticas paralelas de fosforilación de I- κ B (Pi- κ B), degradación de I- κ B (I- κ B) y translocación nuclear de NF- κ B (EMSA) en HUVEC adherentes a fibronectina y esferoides expuestos a TNF/ $IFN\gamma$. **(c)** Análisis por citometría de flujo que muestra una inducción idéntica de la expresión de ICAM-1 en la superficie celular sobre cultivos de HUVEC con fibronectina y esferoides expuestos a TNF (-----) o TNF/ $IFN\gamma$ (—), (.....) células no tratadas. Se muestra la expresión de PECAM1 como control.

Figura 4. La activación de Akt es esencial para la supervivencia de las HUVEC y requiere la ligación de la integrina. **(a)** Detección de Akt fosforilado (Pi-Akt) y total (Akt) en cultivos de HUVEC adherentes a fibronectina y esferoides estimulados con TNF/ $IFN\gamma$ durante el tiempo indicado. **(b)** Panel izquierdo: apoptosis inducida por TNF (T) y TNF/ $IFN\gamma$ (TI) en HUVEC adherentes a fibronectina sensibilizadas a los inhibidores de la cinasa PI-3 wortmanina (W) y LY294002 (LY). La muerte celular se visualizó mediante tinción con YoPro-1. Panel izquierdo: curva de supervivencia de las HUVEC adherentes a fibronectina expuestas a LY294002 (●), TNF/ $IFN\gamma$ (Δ) o LY294002/TNF/ $IFN\gamma$ (▲). (○) cultivos no tratados. **(c)** La cinasa PI-3 activa constitutiva (p110*) y Akt (Aktmp), pero no Akt natural (Aktwt) ni el plásmido control (pBS), promovían la supervivencia de esferoides expuestos a TNF (●) o a TNF/ $IFN\gamma$ (▲). (○) cultivos no tratados. Los cuadros insertados representan los análisis por citometría de flujo de la fluorescencia EGFP de células transfectadas (% de células positivas). **(d)** Las HUVEC electroporadas con plásmido control (pBS) o Akt activo constitutivo (Akt*) e infectadas con Ad Δ NI- κ B o AdLacZ se cultivaron como monocapas que se adhieren a fibronectina o esferoides en ausencia (C) o en presencia de TNF (T) o TNF/ $IFN\gamma$ (TI). Las células apoptóticas se detectaron mediante tinción con YoPro-1. Las células adherentes a fibronectina viables se tiñeron con cristal violeta, **(e)** Las HUVEC se electroporaron con plásmido control (símbolos rellenos) o pAktmp (símbolos no rellenos), se infectaron con Ad Δ NI- κ B (○/●) o AdLacZ (Δ /▲) y se cultivaron sobre fibronectina en presencia de concentraciones

crecientes de TNF y se determinaron las células unidas viables mediante la determinación de la D.O. de los pocillos teñidos con cristal violeta. **(f)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de ICAM-1 en HUVEC no tratadas (...) o HUVEC tratadas con TNF (-----) y TNF/LY294002 (—) (panel izquierdo), así como HUVEC infectadas con Ad Δ NI- κ B (panel central) o AdLacZ y expuestas a TNF (-----) y TNF/IFN γ (—).

Figura 5. (a-c) Análisis mediante inmunotransferencia de Pi-Akt, MDM2, p53, Pi-FKHR/FRKHL1 **(a)** y Pi-MEK, Pi-p38 y Pi-JNK y Pi-ERK en cultivos de células HUVEC con fibronectina y de esferoides expuestos a TNF/IFN γ durante el tiempo indicado. Se muestra que las proteínas Akt total, FKHR, MEK, p38, ERK y JNK presentan igual proteína total. Los cultivos de esferoides presentan fosforilación deficiente de Akt y FKHR/FRKHL1, aumento de los niveles de p53 y potenciación de la fosforilación de MEK, p38, ERK y JNK en respuesta a TNF/IFN γ en comparación con las células adherentes a fibronectina.

Figura 6. La disminución de la ligación de la integrina potencia la citotoxicidad de TNF *in vitro*. **(a)** Las HUVEC se cultivaron sobre fibronectina o PLL durante 16 horas en ausencia (C) o presencia de TNF (T) o TNF/IFN γ (TI). Las células adherentes apoptóticas y viables se revelaron mediante tinción con YoPro-1 y cristal violeta, respectivamente. **(b)** EMD121974 alteraba la adhesión de las HUVEC mediada por $\alpha_v\beta_3$ sobre gelatina (■) pero no el componente $\alpha_5\beta_1$ de la adhesión mediada por $\alpha_5\beta_1/\alpha_v\beta_3$ a la fibronectina (●). El péptido control EMD135981 era ineficaz (símbolos vacíos). **(c)** Las HUVEC se cultivaron sobre fibronectina en ausencia (C) o presencia de TNF/IFN γ (TI), EMD121974 y EMD135981 como se indica. Las células apoptóticas y adherentes se revelaron mediante tinción con YoPro1 y mediante microscopía de contraste, respectivamente. **(d)** Curvas de viabilidad de las HUVEC del experimento del panel c. Sin péptido (○/●); EMD121974 (A/A); EMD135981 (□/■). Cultivos no tratados, símbolos vacíos. Cultivos tratados con TNF/IFN γ , símbolos rellenos. **(e)** Curvas de viabilidad de HUVEC electroporadas con Aktmp (símbolos vacíos) o pBS (símbolos rellenos), y cultivadas sobre fibronectina y expuestas a TNF/IFN γ solo (○/●) o en presencia de péptidos EMD121974 (Δ/\blacktriangle) o EMD135981 (□/■). Aktmp prevenía la muerte celular inducida por el tratamiento combinado de EMD121974 y TNF/IFN γ .

Figura 7. La disminución de la ligación de la integrina potencia la citotoxicidad del TNF *in vivo*. Ratas BN portadoras del sarcoma de tejidos blandos singénico BN-175 fueron tratadas con EMD121974 (□), TNF (Δ) o EMD121974/TNF (■) mediante la técnica de ILP. (○) ratas con tratamiento simulado. El crecimiento tumoral se determinó durante 6 días desde la ILP. Los resultados representan el volumen medio del tumor \pm e.e.m. (n = 6). Se implantaron fragmentos pequeños del sarcoma de tejidos blandos singénico BN-175 en la pata trasera derecha de ratas BN machos y el tratamiento se inició cuando el diámetro del tumor alcanzaba los 12-14 mm (Manusama y col., *Oncol. Rep.* 6, 173-177 (1999)). La arteria y la vena femorales se canularon con tubos de silicona y las colaterales se ocluyeron con un torniquete. La perfusión se realizó durante 30 min con 5 ml de Heamaccel® (2,4 ml/min) en donde los fármacos se añadieron como bolos (EMD121974, 500 μ g, concentración final en la perfusión 170 μ M; TNF, 50 μ g). El perfundido se oxigenó y la pierna se mantuvo a 38-39°C con una manta caliente. Las ratas perfundidas con EMD121974 también recibieron administración sistémica del péptido 2 horas antes y 3 horas después de la ILP (100 mg/kg i.p.). El diámetros del tumor se determinó en dos direcciones mediante la medición con un calibre y se calculó el volumen tumoral (V) ($V = 0,4$) (A^2XB , donde B representa el diámetro más largo y A el diámetro perpendicular a B). Se trataron 6 ratas por grupo. Los efectos secundarios locales y sistémicos se evaluaron como se ha descrito (Manusama y col., *Oncol. Rep.* 6, 173-177 (1999)).

Figura 8. La disminución de la ligación de integrinas potencia *in vitro* la citotoxicidad inducida por TNF, TRAIL y FasL. Las HUVEC se cultivaron durante la noche en placas de microvaloración recubiertas de fibronectina en ausencia (control) o presencia de EMD121974 (300 μ M), TNF (200 ng/ml), FasL (200 ng/ml), TRAIL (200 ng/ml), LIGHT (200 ng/ml) e IFN γ (330 ng/ml) como se indica. La viabilidad se determinó mediante ensayos MST.

La invención puede describirse con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: células endoteliales con adhesión dependiente de integrina frente a apoptosis inducida por TNF α .

La formación de esferoides y la supervivencia de las HUVEC no requieren integrinas

Para probar el efecto de ligación de integrinas sobre la apoptosis inducida por TNF se identificaron condiciones en las que las células endoteliales podrían cultivarse sin adhesión dependiente de integrina. Las suspensiones celulares únicas de células endoteliales mueren rápidamente por anoikis (Meredith y col., *Mol. Biol Cell.* 4, 953-961 (1993)) impidiendo de este modo análisis adicionales. Pero sembrando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) a alta densidad ($1,0 \times 10^6$ células/ml) en pocillos recubiertos con BSA los esferoides multicelulares se formaban en 2 a 4 horas y podían mantenerse durante más de 24 horas dependiendo de la VE-cadherina y sin ninguna contribución detectable de las integrinas. La inhibición de la actividad VE-cadherina bloqueando el anticuerpo monoclonal (AcM) o mediante la depleción de Ca $^{2+}$ y Mg $^{2+}$ con EDTA, bloqueaba la formación de esferoides, mientras que los AcM inhibidores frente a las integrinas α_2 , α_3 , α_5 , α_6 , β_1 , $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$, péptidos bloqueantes basa-

dos en RGD y AcM anti-PECAM-1 bloqueante, solos o en combinación, no afectaban a los esferoides de HUVEC (Fig. 1a y datos no mostrados).

5 Para determinar el efecto del cultivo de esferoides sobre la viabilidad celular se recuperaron los esferoides y las HUVEC adherentes a fibronectina entre 6 y 72 horas después de la siembra, se diluyeron de forma seriada y se cultivaron adicionalmente durante 48 horas más antes de que se determinara el número relativo de células. Un desvío hacia la izquierda o aplanamiento de la curva de dilución indica una disminución de la viabilidad. A las 6, 12, 16 y 24 horas tras la siembra, la viabilidad de las HUVEC recuperadas de cultivos de esferoides era comparable con la de los cultivos adherentes a fibronectina, pero a partir de las 36 horas esta disminuía progresivamente (Fig. 1b a las 16 horas, y datos no mostrados).

10 En conjunto, estos resultados demuestran que las HUVEC pueden formar esferoides y son viables durante más de 24 horas en ausencia de la adhesión dependiente de integrinas.

Ejemplo 2: *la adhesión a fibronectina protege a las HUVEC frente a la apoptosis inducida por TNF.*

15 Para comprobar si las integrinas modulan la apoptosis inducida por TNF, se cultivaron HUVEC sobre fibronectina (adhesión dependiente de integrina) o como esferoides (adhesión independiente de integrina) en ausencia o presencia de TNF (200 ng/ml) y de IFN γ (330 ng/ml), un potenciador de la citotoxicidad del TNF (Dealtry y col., *Eur. J. Immunol.* **17**, 689-693 (1987)). La exposición de monocapas de HUVEC sobre fibronectina ("HUVEC adherentes a fibronectina") a TNF \pm IFN γ no aumentaba la apoptosis como se demostró por la presencia de captación de YoPro-1 (Idziorek y col., *J. Immunol. Methods* **185**, 249-258 (1995)), la unión a la superficie celular de la anexina V, la activación de caspasa-3 y la escisión de su sustrato PARP (Fig. 2a, 2b y datos no mostrados). Por el contrario, los esferoides tratados con TNF \pm IFN γ aumentaron la captación de YoPro-1 (aumento suprimido por los inhibidores de las caspasas BOC, Z-VAD, IETD y DVED), la fragmentación de ADN, la activación de la caspasa 3 y la escisión de PARP (Fig. 2a, 2b y datos no mostrados). Para examinar el efecto de TNF \pm IFN γ sobre la superficie celular se determinó la viabilidad de cultivos tratados y no tratados. La exposición de las HUVEC adherentes a fibronectina a TNF \pm IFN γ no tenía efecto sobre la viabilidad celular (Fig. 2c). El tratamiento de esferoides con TNF resultó en más del 80% de muerte celular y el tratamiento combinado TNF \pm IFN γ causó la muerte celular completa (Fig. 2d). El tratamiento solo con IFN γ no era citotóxico (datos no mostrados). Las HUVEC se adhieren a la fibronectina inmovilizada a través de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ (Rüegg y col., *Nature Med.* **4**, 408-414 (1998)). Para comprobar la contribución individual de estas integrinas a la supervivencia celular sobre fibronectina, se cultivaron HUVEC sobre AcM inmovilizados en plástico (AcMi) dirigidos frente a las integrinas $\alpha_v\beta_3$, α_1 , α_5 y α_4 . Los anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_3$, anti- α_5 anti- α_1 inmovilizados protegían a las HUVEC frente a la muerte inducida por TNF, mientras que los AcM anti- α_4 no lo hacían (Fig. 2e y datos no mostrados).

A partir de estos resultados se concluyó que la adhesión mediada por las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_1$ suprime la apoptosis inducida por TNF y su ausencia sensibiliza las HUVEC al TNF y a la apoptosis mediada por caspasas.

35 **Ejemplo 2:** *la señalización dependiente de integrinas protege a las células endoteliales frente a la apoptosis inducida por TNF α .*

La activación de NF- κ B inducida por TNF no requiere ligación de integrinas

40 La activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) favorece la supervivencia de las células expuestas a TNF (Beg y Baltimore, *Science* **274**, 782-784; Van Antwerp y col., *Science* **274**, 787-789 (1996)). Puesto que la adhesión celular a través de las integrinas activa el NF- κ B (Scatena y col., *J. Cell Biol.* **141**, 1083-1093 (1998)), se investigó si la sensibilidad de los esferoides a la apoptosis inducida por TNF era debida a la falta de activación de NF- κ B. La activación de NF- κ B se evaluó determinando la fosforilación y degradación de I- κ B, la translocación nuclear de NF- κ B y la expresión en la superficie celular de ICAM-1, un gen que induce NF- κ B (Collins y col., *Faseb J.* **9**, 899-909 (1995)), en cultivos de células HUVEC esferoides y adherentes a fibronectina expuestas a TNF \pm IFN γ . No se observaron diferencias significativas en la fosforilación y degradación de I- κ B, en la translocación nuclear de NF- κ B ni en la expresión de ICAM-1 (Fig. 3a-c), lo que indica que la apoptosis inducida por TNF de las HUVEC cultivadas en esferoides no era debida a una alteración en la activación de NF- κ B.

Ejemplo 3: *La activación depende de la ligación de integrinas y es esencial para la supervivencia celular*

50 A continuación, se analizó la activación de Akt / PKB, una proteína cinasa activada por TNF que promueve la supervivencia de las células endoteliales (Madge y Pober, *J. Biol. Chem.* **275**, 15458-15465 (2000)). La fosforilación basal de Akt aumentó en las células HUVEC adherentes a fibronectina por la exposición a TNF/IFN γ , lo que coincidía con una activación constitutiva e inducida por TNF de Akt. Por el contrario, no se observó fosforilación de Akt en esferoides no tratados y la exposición a TNF/IFN γ sólo inducía una débil fosforilación (Fig. 4a). Para evaluar la importancia de la activación de Akt para la supervivencia de las células HUVEC, se trataron células adherentes a fibronectina con wortmanina y LY294002, dos inhibidores farmacológicos de la fosfoinosítido-3 (PI-3) cinasa, un activa-

5 dor retrógrado de Akt (Kandel y Hay, *Exp. Cell Res.* **253**, 210-229 (1999)). También se expresó una forma constitutivamente activa de Akt (Aktmp) y de la subunidad catalítica de la cinasa PI-3 (p110*) en esferoides. El tratamiento con wortmanina y LY294002 causaba un aumento de la apoptosis y disminución de la supervivencia de las células adherentes a fibronectina expuestas a TNF±IFN γ (Fig. 4b), mientras que Aktmp y p110*, pero no Akt natural (Aktwt) ni un plásmido control (pBS), protegían a los esferoides de la apoptosis inducida por TNF±IFN γ (Fig. 4c).

A partir de estos resultados se concluyó que la activación de Akt era esencial para la supervivencia de las HUVEC expuestas a TNF±IFN γ y que tanto la activación basal como la inducida por TNF dependían de la ligación de integrinas.

Ejemplo 4: la supervivencia de las HUVEC tratadas con TNF requiere la activación de Akt y NF- κ B

10 Aktmp suprime la apoptosis inducida por TNF de esferoides en presencia de NF- κ B activa. También se comprobó si eran necesarias tanto la activación de NF- κ B como la señalización de Akt activa para la supervivencia o si era suficiente Akt activa sola. Se bloqueó la activación de NF- κ B en células que expresan Akt activa (Aktmp) de forma constitutiva infectando HUVEC con un adenovirus que expresaba un I- κ B no degradable (Ad Δ NI- κ B que previene la disociación de I κ B – NF- κ B (Brown y col., *Science* **267**, 1485-1488 (1995)). Ad Δ NI- κ B sensibilizaba a las HUVEC
15 adherentes a fibronectina a la apoptosis inducida por TNF±IFN γ y no se veía afectado por Aktmp. No tenían efecto la electroporación control (pBS) ni la infección por adenovirus (AdLacZ). Ad Δ NI- κ B también sensibilizaba a los esferoides que sobreexpresaban Aktmp a la apoptosis inducida por TNF±IFN γ (Fig. 4d). Para comprobar si Akt podría proteger frente a dosis bajas de TNF en HUVEC que carecían de activación de NF- κ B, las monocapas adherentes HUVEC naturales y que expresan Aktmp se infectaron con Ad Δ NI- κ B y se expusieron a TNF (0,33 a 100 ng/ml).
20 Ad Δ NI- κ B sensibilizaban las HUVEC a la apoptosis (TNF > 0,1 ng/ml), pero Aktmp no protegía a estas células incluso a estas bajas dosis de TNF (Fig. 4e). Adicionalmente, LY294002 y wortmanina no inhibían la expresión de ICAM-1 inducida por TNF, lo que indicaba que la activación de NF- κ B en las HUVEC no necesitaba señalización Akt (Fig. 4f y datos no mostrados) y coincidía con la inducción de ICAM-1 en esferoides (véase la figura 3c). Por el contrario, la infección de HUVEC con Ad Δ NI- κ B suprimía la expresión de ICAM-1 en respuesta a TNF±IFN γ (Fig. 4f).

25 Considerando todos estos resultados se demostraba que la supervivencia de las HUVEC expuestas a TNF±IFN γ requería la activación simultánea de Akt y NF- κ B.

Ejemplo 5: la ligación de integrinas estimula la activación de FKHR y MDM2 y suprime la fosforilación de MEK, p38 y JNK

30 La actividad antiapoptótica de Akt se atribuyó originalmente a su fosforilación e inhibición de la caspasa-9 y Bad (Datta y col., *Genes Dev.* **13**, 2905-2927 (1999)). Sin embargo, ahora se ha demostrado que la supervivencia dependiente de Akt está implicada en la fosforilación e inhibición de los factores de transcripción Forkhead (FKHR/FKHL1) (Datta y col., *Genes Dev.* **13**, 2905-2927 (1999); Brunet y col., *Cell* **96**, 857-868 (1999)) y de MDM2, degradación de p53 (Mayo y Donner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11598-11603 (2001)) y supresión de la activación de las proteína cinasas ERK, p38 y JNK (Rommel y col., *Science* **286**, 1738-1741 (1999); Gratton y col.,
35 *J. Biol. Chem.* **276**, 30359-30365 (2001); Park y col., *J. Biol. Chem.* **277**, 2573-2578 (2002); Madge y Pober, *J. Biol. Chem.* **275**, 15458-15465 (2000)). Se estudió si una ligación de integrina y señalización Akt deficientes estaban asociadas con alteraciones en estas vías de señalización. Se determinaron los niveles de MDM2, p53 y de FKHR/FRKHL1, MEK, p38 y JNK fosforilados en HUVEC adherentes y esferoides expuestas a TNF/IFN γ . Estos esferoides presentaban una fosforilación deficiente de FKHR/FKHL1, niveles reducidos de MDM2 y acumulación de
40 p53, en comparación con las células adherentes a fibronectina (Fig. 5a). Además, los esferoides presentaba un aumento de la fosforilación basal e inducida por TNF/IFN γ de MEK, p38 y JNK (Fig. 5b).

Estos resultados coinciden con la función de Akt favoreciendo la supervivencia mediante la inhibición de FKHR/FKHL1, la reducción de los niveles de p53 y la supresión de la fosforilación de MEK, p38 y JNK.

45 **Ejemplo 6:** la inhibición de la adhesión dependiente de integrina por compuestos moleculares pequeños sensibiliza a las células endoteliales frente a la apoptosis inducida por TNF α *in vitro* e *in vivo*.

La reducción en la ligación de integrina sensibiliza las HUVEC adherentes a la apoptosis inducida por TNF

50 El aumento de la sensibilidad a TNF en condiciones de reducción de la ligación de integrina no es único para los esferoides: las HUVEC cultivadas sobre poli-L-Lisina (PLL), un sustrato que favorece la adhesión independiente de integrina (Bershadsky y col., *Curr. Biol.* **6**, 1279-1289 (1996)) sobrevivía en PLL y la adición de TNF±IFN γ causada una muerte masiva (Fig. 6a), una muerte prevenida por la expresión de Aktmp (no mostrado). Además, se inhibía selectivamente la integrina $\alpha_v\beta_3$ en HUVEC sobre fibronectina con EMD121974 ((Arg-Gly-Asp-D-Phe-[N-Me]-Val) cíclico), un ciclopeptido antagonista de $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ (Dechantsreiter y col., *J. Med. Chem.* **42**, 3033-3040 (1999)) que no afecta al componente $\alpha_5\beta_1$ de la adhesión a fibronectina dependiente de $\alpha_5\beta_1/\alpha_v\beta_5$ (Fig. 6b). Mientras que ni TNF/IFN γ ni EMD121974 solos afectaban a la supervivencia, la exposición combinada a TNF/IFN γ y EMD121974

(pero no un péptido control no inhibidor EMD135981) aumentaba la apoptosis y el desprendimiento (Fig. 6c) y reducía la supervivencia (Fig. 6d). La expresión de Aktmp protegía a las HUVEC adherentes a fibronectina frente a la apoptosis inducida por TNF, IFN γ y EMD121974 (Fig. 6e).

5 **Ejemplo 7:** *la reducción de la ligación de integrina sensibiliza a las HUVEC adherentes a la apoptosis inducida por diferentes ligandos de muerte de la familia de ligandos TNF.*

El aumento de la sensibilidad a los efectos proapoptóticos de señalización del receptor de muerte tras la reducción de la ligación de integrina no se veía restringido por el TNF, aunque también se observó cuando las HUVEC, cultivadas sobre fibronectina, se expusieron a TRAIL y FasL en presencia de EMD121974. LIGHT, un ligando que se une a los receptores que carecen de un dominio de muerte, no mostraba sinergismo con el bloqueo de $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 7).

10 **Ejemplo 8:** *EMD121974 sensibilizaba a tumores establecidos a la actividad antitumoral del TNF*

Las células endoteliales angiogénicas expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$ y la ligación de $\alpha_v\beta_3$ favorece la supervivencia de las células endoteliales (Brooks y col., *Cell* **79**, 1157-1164 (1994); Brooks y col., *Science* **264**, 569-571 (1994)). La observación de que EMD121974 sensibilizaba a las células endoteliales a la apoptosis inducida por TNF *in vitro*, sugería que este compuesto podría potenciar la actividad antitumoral del TNF. Para comprobar esta hipótesis se trató a ratas portadoras de sarcoma de tejidos blandos singénico BN175, un tumor muy agresivo y vascularizado resistente a la citotoxicidad de TNF *in vitro* e *in vivo* (Manusama y col., *Oncol. Rep.* **6**, 173-177 (1999)). Se utilizó la técnica de perfusión aislada de extremidades (ILP) para administrar TNF, EMD121974, o una combinación de ambas, a las extremidades portadoras de tumores. El tratamiento con TNF o el péptido solo no tenía impacto sobre el crecimiento del tumor. La administración combinada de TNF y EMD121974, por el contrario, causaba una regresión completa del tumor en el 50% de los animales y una reducción general significativa del crecimiento tumoral (Fig. 8). No se observó toxicidad local o sistémica en los animales tratados con EMD121974/TNF, lo que indicaba que EMD121974 sensibilizada selectivamente hacia la citotoxicidad de TNF. Puesto que las células tumorales BN175 no eran sensibles a TNF y no expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$ activa según la evaluación de su mala adhesión al fibrinógeno incluso en presencia de altas concentraciones de Mn $^{2+}$, y su baja sensibilidad a inhibidores selectivos de $\alpha_v\beta_3$ como EMD121974 (observaciones no publicadas), se concluyó que lo más probable es que el efecto antitumoral sinérgico suponga una interrupción de la vasculatura tumoral.

Considerando todos los datos *in vitro*, estos apoyan con fuerza la importancia de la integrina $\alpha_v\beta_3$ con respecto a $\alpha_v\beta_1$ en este sistema para controlar la supervivencia endotelial.

Ejemplo 9: *cultivo y electroporación de HUVEC*

30 Las HUVEC se prepararon y cultivaron como se describió previamente (Ruegg y col., *Nature Med* **4**, 408-414 (1998)) y se usaron entre los pases 3 y 7. El medio completo es: M199 (Life Technologies, Basilea, Suiza), STF al 10% (Seromed, Berlín, Alemania), 12 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de cerebro bovino (Clonetics-Bio Whittaker, Walkersville, MD, EE. UU.), 10 ng/ml de EGF rec. humano (Peprotech, Londres, Reino Unido), 25 U/ml de heparina, 1 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona (Sigma Chemie), L-glutamina 2 mM, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina y 100 U/ml de penicilina (Life Technologies). Para la electroporación, las HUVEC se resuspendieron en medio completo, se incubaron en hielo durante 5 minutos con el ADN (20 μg de plásmido específico y 5 μg de pEGFP-C1) y se electroporaron con un Gene Pulser (Biorad, Glattbrugg, Suiza). Las HUVEC electroporadas se cultivaron durante 48 horas antes de su uso. Aproximadamente el 80% de las células expresaban EGFP 40 horas después de la electroporación.

Ejemplo 10: *formación de esferoides*

40 Las HUVEC se recogieron mediante tripsinización, se resuspendieron en medio completo a $1,0 \times 10^6$ células/ml y se sembró 1 ml/pocillo en placas de cultivo no tisular de 12 pocillos (Evergreen Scientific, Los Angeles, CA, EE. UU.) previamente recubiertas con BSA al 1%. Para los estudios de agregación, se sembraron 200 μl de la suspensión celular en micropocillos de placas de ELISA (Maxisorp II, NUNC, Roskilde, Dinamarca) recubiertos de BSA al 1% solas o en presencia de AcM (10 $\mu\text{g/ml}$), EDTA (5 mM) o Ca $^{2+}$ /EDTA (10/5 mM). La formación de esferoides se evaluó a las 6 horas y a las 16 horas. Se tomaron microfotografías con un microscopio Televal 31 (Carl Zeiss AG, Zúrich, Suiza).

Ejemplo 11: *análisis morfológico de esferoides*

50 Para la evaluación morfológica, los esferoides se incluyeron en Epon (Fluka Chemie) y los cortes gruesos se tiñeron con azul de metileno al 1%. Para la inmunotinción, los cortes de esferoides congelados se fijaron en formaldehído al 4% (Fluka Chemis, Buchs, Suiza). Tras el bloqueo con BSA al 1%, los cortes se incubaron secuencialmente durante 1 hora con AcM (20 $\mu\text{g/ml}$) y un antisuero de cabra anti-ratón marcado con Cyan3 (West Grove, PA, EE. UU.). Para la reacción TUNEL, los cortes de esferoides congelados se fijaron en paraformaldehído al 4% y se procesaron como se ha descrito (Ruegg y col., *l.c.*). Los esferoides se contrastaron con yoduro de propidio para determinar el

contenido total de ADN. Los cortes se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axioskop, Carl Zeiss AG) equipado con una cámara CCD (Photonic Science, Milham, Reino Unido) o con un microscopio confocal láser (LSM 410, Carl Zeiss AG). El índice de apoptosis se determinó calculando la relación entre los píxeles verdes (tinción TUNEL del ADN fragmentado) y rojos (tinción con yoduro de propidio por ADN total).

- 5 El número de esferoides analizados por condición fueron: C, 31; T, 21; TI, 12. Para la detección de células apoptóticas en cultivos, se añadió el colorante de ADN YoPro-1 (250 nM) al cultivo completo o a las células flotantes recogidas (Delhase, M., Li, N. y Karin, M. Kinase regulation in inflammatory response. *Nature* 406, 367-368. (2000)). Los cultivos se estudiaron mediante un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DM IRB, Heerbrugg, Suiza). Para microscopía electrónica, los esferoides se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 100 mM y se fijaron posteriormente en OsO₄ al 1%. Las células se deshidrataron en etanol y se incluyeron en Epon. Los cortes ultrafino se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10.

Ejemplo 12: supervivencia y proliferación celular

- 15 Para estudiar la supervivencia, los esferoides de HUVEC sembrados en placa a 1×10^6 células/ml en pocillos de 24 mm recubiertos con BSA al 1% o células adherentes sembradas en placas a 4×10^5 células en pocillo de 35 mm recubiertos de fibronectina a 3 μ g/ml (Evergreen Scientific), se estimularon con TNF α (200 ng/ml= 10^4 U/ml) \pm IFN γ (330 ng/ml= 10^4 U/ml). Se añadieron inhibidores de cinasas o péptidos EMD 1 hora o 4 horas antes de la estimulación, respectivamente a las concentraciones siguientes: wortmanina, 100 nM; LY294002, 20 μ M, péptidos EMD, 300 μ M. Después de 16 horas de cultivo, las células se recogieron mediante disociación (5 minutos a 20°C para los esferoides) con EDTA 5 mM o tripsina 1x (para cultivos adherentes), se lavaron, resuspendieron en medio completo a 4×10^5 células/ml, se alicuotaron a 100 μ l/pocillo en placas de cultivo tisular de microvaloración (Falcon, Becton Dickinson) y se valoraron en diluciones 1:2 por triplicado. El número relativo de células se evaluó 48 horas después determinando la conversión MTT durante las últimas 4 horas de cultivo. Los resultados se dan como valores de D.O. a 540 nm (Packard Spectra Count, Meriden, CT. EE. UU.) y se representa la media de los pocillos por triplicados \pm d.e.

- 25 **Ejemplo 13: ensayo de desprendimiento celular**

- Las placas de ELISA Maxisorp II se recubrieron con 1 μ g/pocillo de fibronectina o gelatina al 0,5% durante la noche a 4°C en PBS. Los pocillos recubiertos se lavaron y bloquearon con BSA al 1% durante 2 horas a 37°C y se lavaron antes de su uso. Se añadieron 2×10^4 células/pocillo en medio basal sin STF y se sedimentaron brevemente mediante centrifugación (40xg). Se dejó que las células se adhirieran durante 2 horas a 37°C antes de añadir los péptidos a concentraciones crecientes. Después de 2 horas, los pocillos se lavaron con PBS templado y las células adheridas se fijaron en paraformaldehído al 2%, se tiñeron con cristal violeta al 0,5% (Sigma Chemie) y se cuantificaron mediante la lectura de la D.O a 620 nm (Packard Spectra Count). Los resultados se dan como valores de D.O y se representa la media de los pocillos duplicados \pm d.e. de la adhesión específica (= adhesión a proteína de la MEC menos adhesión a BSA).

- 35 **Ejemplo 14: citometría de flujo**

La inmunotinción indirecta de HUVEC y la detección de la expresión de EGFP se realizaron siguiendo el protocolo convencional (Ruegg y col., *l.c.*). Las células muertas se excluyeron mediante tinción con yoduro de propidio. Todas las muestras se analizaron con un software FACScan II[®] y Cell Quest[®] (Becton Dickinson, Mountain View CA, EE. UU.)

Ejemplo 15: ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

- 40 Los extractos nucleares de HUVEC (1×10^6 células por condición) se prepararon como se describe (Cai y col., *J Biol Chem* **272**, 96-101 (1997)) y se incubaron con un oligonucleótido 31-mer sintético de cadena doble que contenía las secuencias kB de la repetición terminal larga del VIH humano marcado en su extremo con [γ -³²P]ATP usando la cinasa T4. La unión de NF-kB al oligonucleótido marcado con ³²P se determinó mediante PAGE y autorradiografía.

Ejemplo 16: inmunotransferencia

- 45 Se separaron 50 μ l de un sobrenadante de lisado celular (1×10^6 en 250 μ l de tampón de Laemmli 2x) en PAGE-SDS del 7,5% a 12,5% y se transfirieron mediante transferencia húmeda (Bio Rad) a membranas Immobilon-P (Millipore, Volketswil, Suiza). Las membranas se incubaron secuencialmente en leche en polvo al 5% durante 1 hora, con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C y con un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con HRP (Dako, Zug, Suiza) durante 1 hora. Se usó el sistema ECL para la detección (Amersham-Pharmacia Biotech). Para realizar de nuevo la prueba, se eliminaron los anticuerpos de las membranas en SDS al 2%, Tris 50 mM y BME 100 mM, durante 30 minutos a 50°C.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende en una cantidad terapéuticamente eficaz al menos
 - (I) un agente antiangiogénico, en el que dicho agente antiangiogénico se selecciona entre el *ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y
- 5 (ii) factor de necrosis tumoral alfa (TNF α),
opcionalmente junto con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
2. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de tumores y metástasis tumorales que comprende al menos
 - (I) un agente antiangiogénico, en el que dicho agente antiangiogénico se selecciona entre el *ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, y
- 10 (ii) factor de necrosis tumoral alfa (TNF α),
opcionalmente junto con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1 o una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que dicho agente antiangiogénico y TNF α están unidos entre sí para formar una molécula de fusión.
- 15 4. Una composición farmacéutica según las reivindicación 1, 2 o 3, que además comprende al menos un agente citotóxico y/o quimioterapéutico.
5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que dicho agente citotóxico es interferón gamma (IFN γ).
- 20 6. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 y/o 5, en la que dicho compuesto quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por cisplatino, doxorrubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel (taxol) y bleomicina.
7. Una composición farmacéutica según una o más de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende
 - (i) *ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y/o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,
- 25 (ii) TNF α y, opcionalmente,
(iii) IFN γ .
8. Un kit farmacéutico para tratar tumores y metástasis tumorales que comprende un envase que contiene
 - (i) al menos un agente antiangiogénico, en el que dicho agente antiangiogénico se selecciona entre el *ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo;
- 30 (ii) TNF α y, opcionalmente,
(iii) un agente citotóxico y/o quimioterapéutico.
9. Un kit farmacéutico según la reivindicación 8, en el que el agente citotóxico es IFN γ .
10. Un kit farmacéutico según las reivindicaciones 8 y/o 9 que comprende
 - (i) *ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal),
- 35 (ii) TNF α e
(iii) IFN γ .

11. Un kit farmacéutico según una o más de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dichos agentes farmacéuticamente activos se proporcionan en recipientes independientes en dicho envase.
12. Uso de
- 5 (i) al menos un agente antiangiogénico, seleccionado entre *ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo y
- (ii) factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)
- para la obtención de un medicamento para su administración simultánea o secuencial para tratar tumores o metástasis tumorales en un individuo.
- 10 13. El uso según la reivindicación 12, en el que el medicamento es para su uso en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente citotóxico y/o quimioterapéutico.
14. El uso según la reivindicación 13, en el que dicho agente citotóxico es IFN γ .
15. El uso según la reivindicación 13, en el que dicho agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel (taxol) y bleomicina.
- 15 16. El uso según una o más de las reivindicaciones 12 a 14, en el que se usa una cantidad terapéuticamente eficaz de
- (i) *ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal),
- (ii) TNF α y, opcionalmente,
- (iii) IFN γ
- para la obtención de un medicamento que se administrará a dicho individuo simultánea o secuencialmente.
- 20 17. *Ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de tumores y metástasis tumorales en combinación con TNF α , opcionalmente junto con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
18. *Ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 17, adicionalmente junto con IFN γ .
- 25 19. *Ciclo*(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según las reivindicaciones 17 o 18, adicionalmente junto con al menos un agente quimioterapéutico seleccionado entre el grupo compuesto por cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel (taxol) y bleomicina.

Fig. 1a

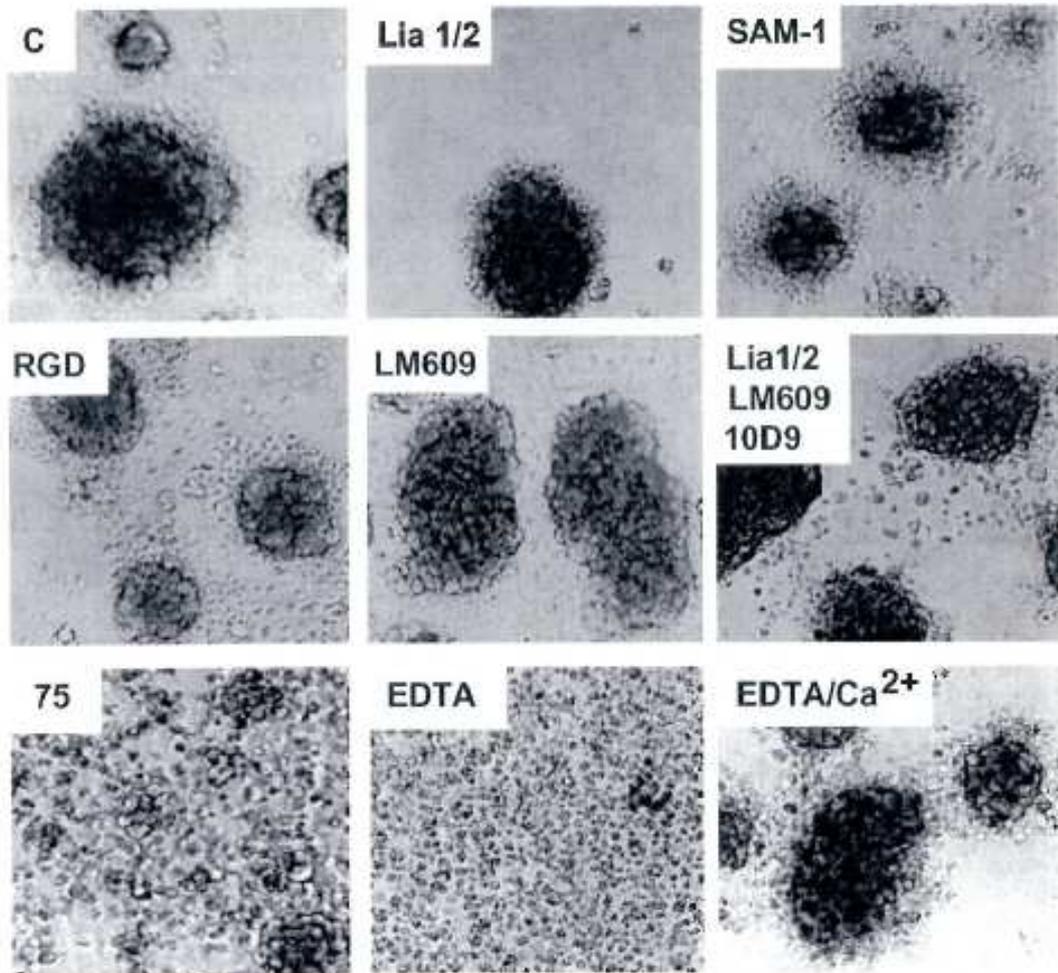


Fig. 1b

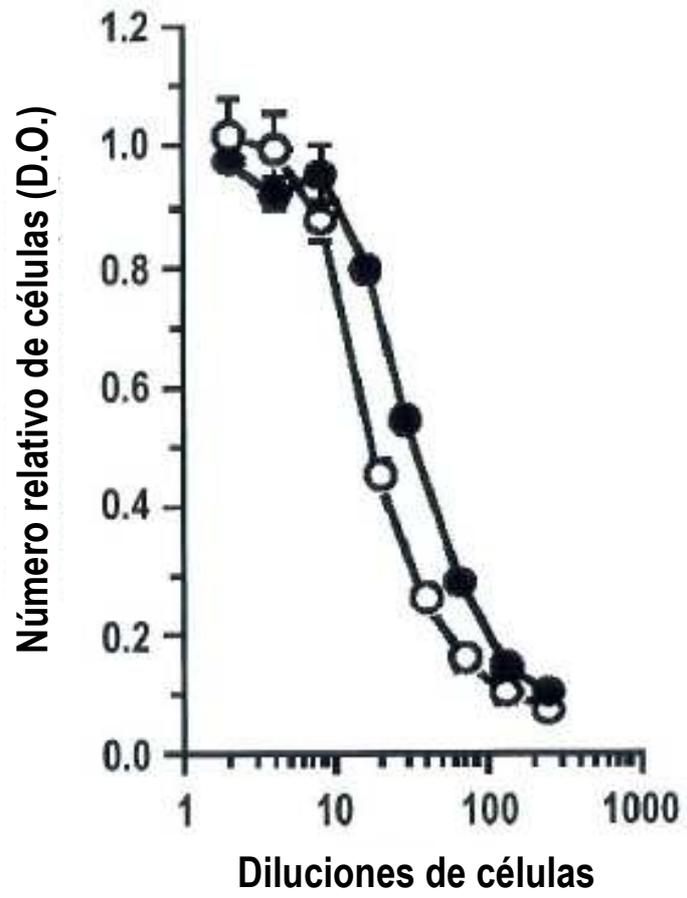


Fig. 2a

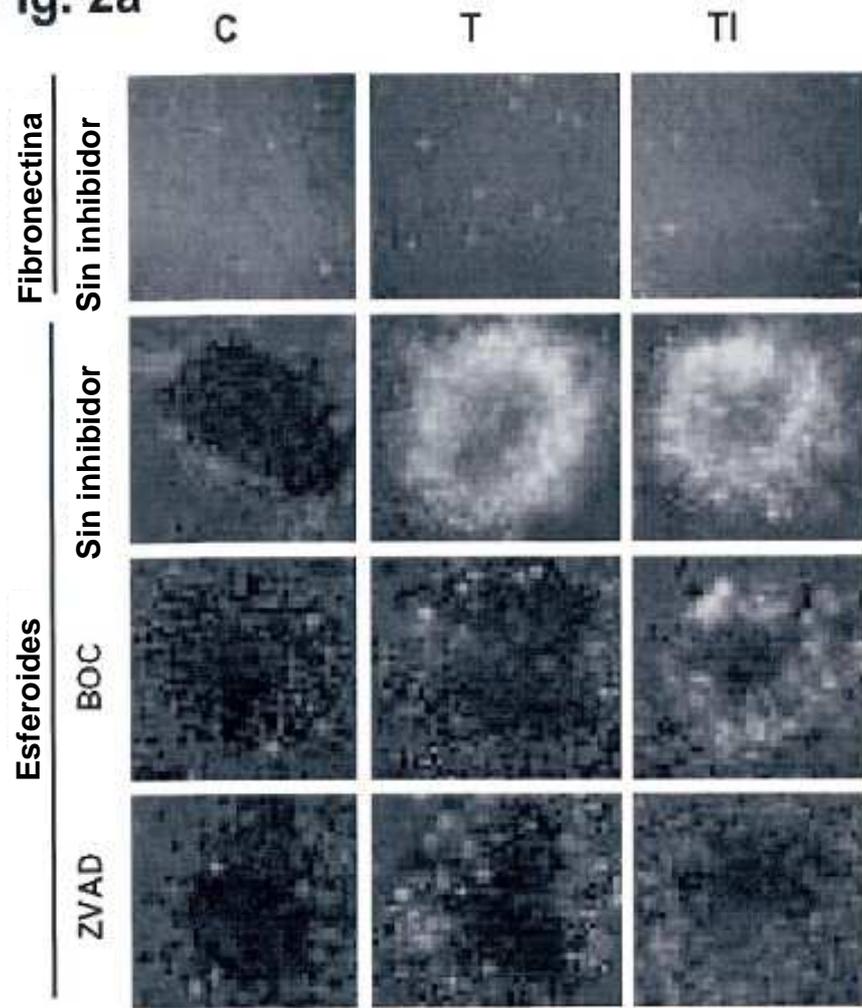


Fig. 2b

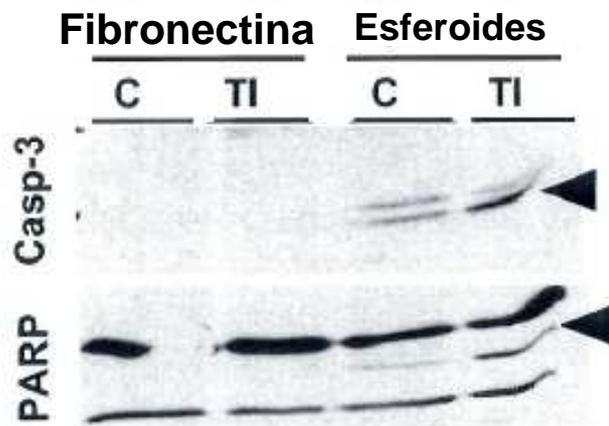


Fig. 2c

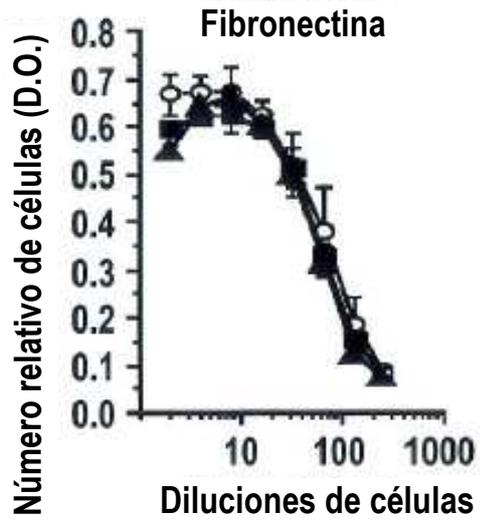


Fig. 2d

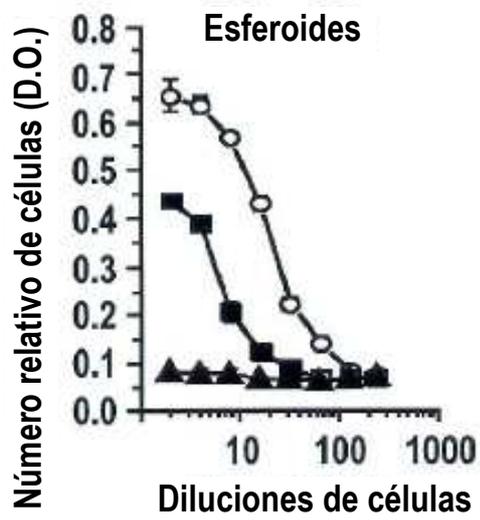


Fig. 2e

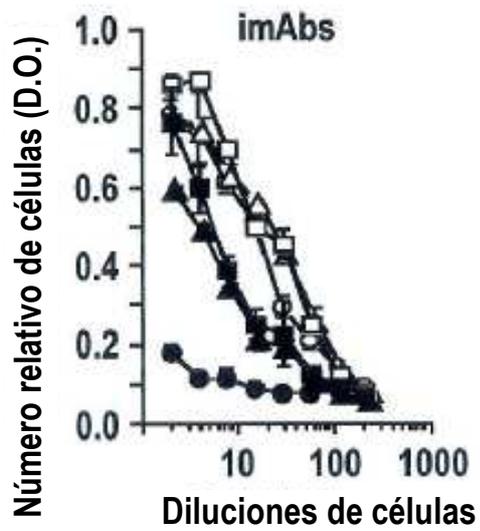


Fig. 3a

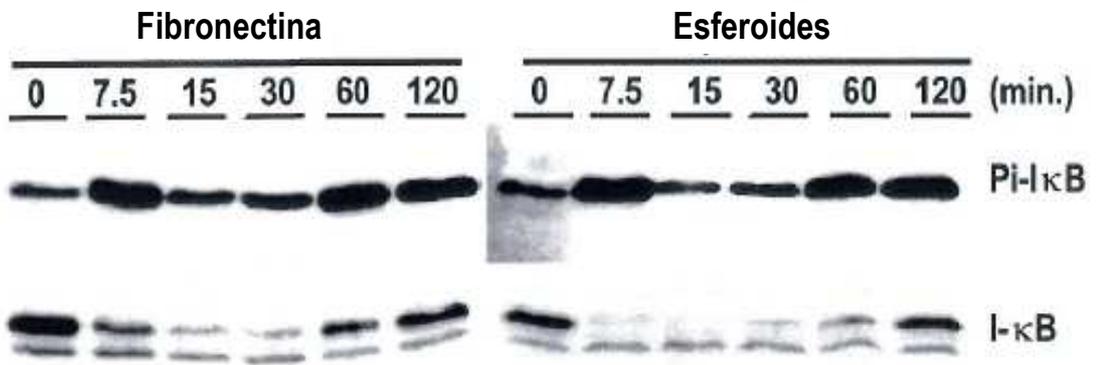


Fig. 3b

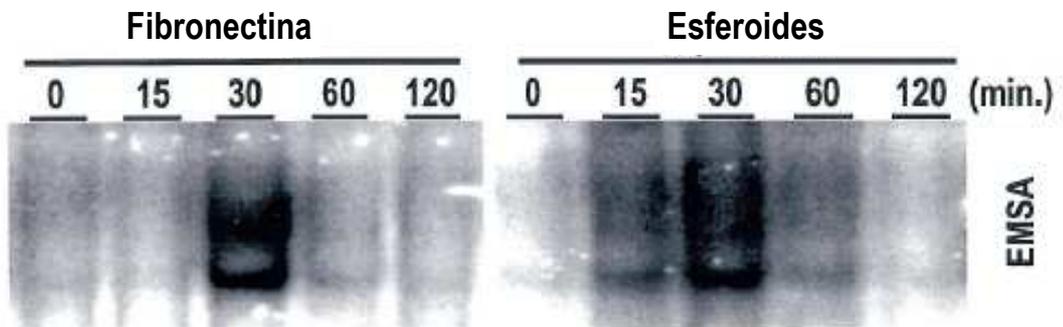


Fig. 3c

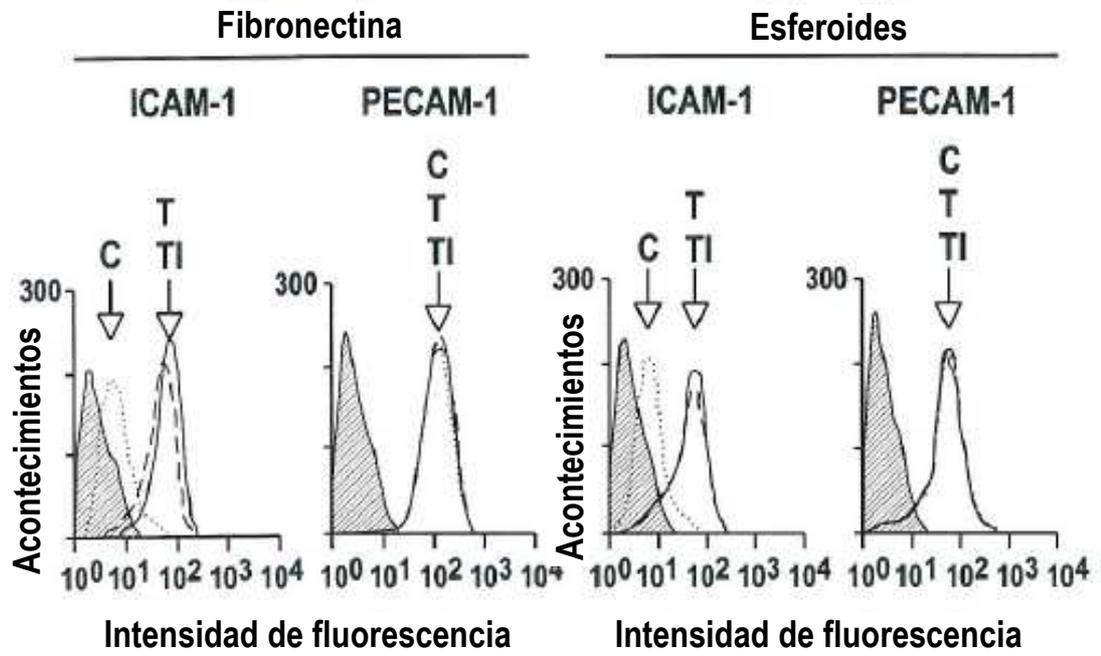


Fig. 4a

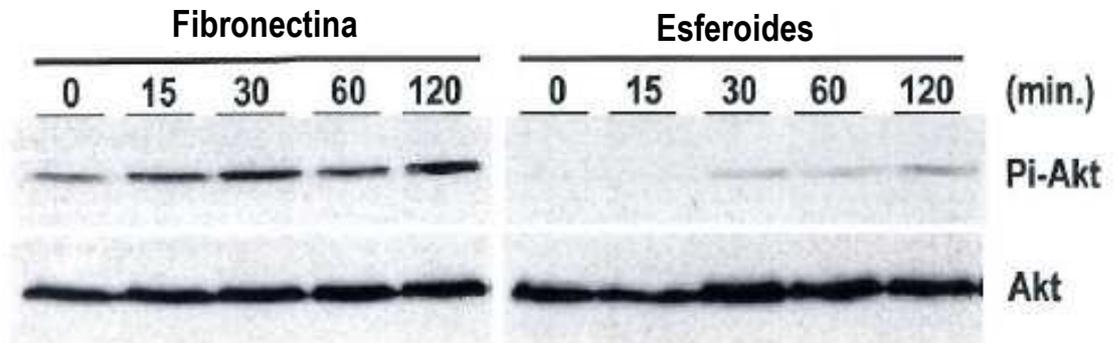


Fig. 4b

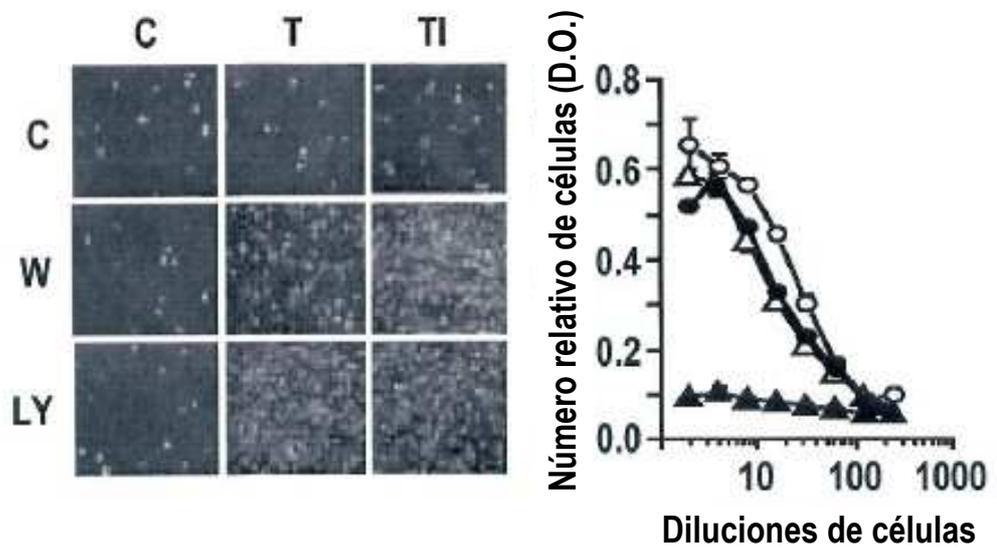


Fig. 4c

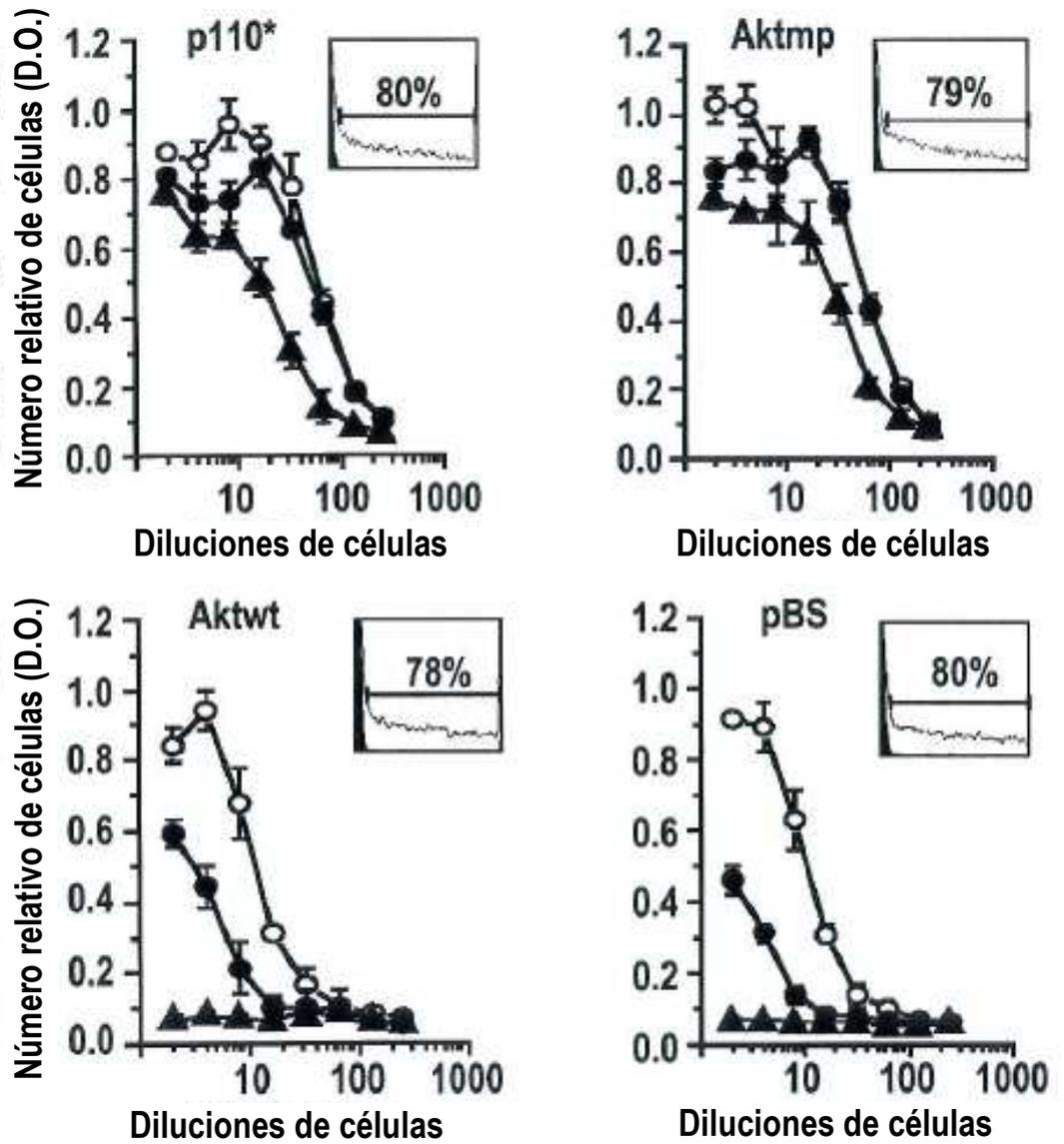


Fig. 4d

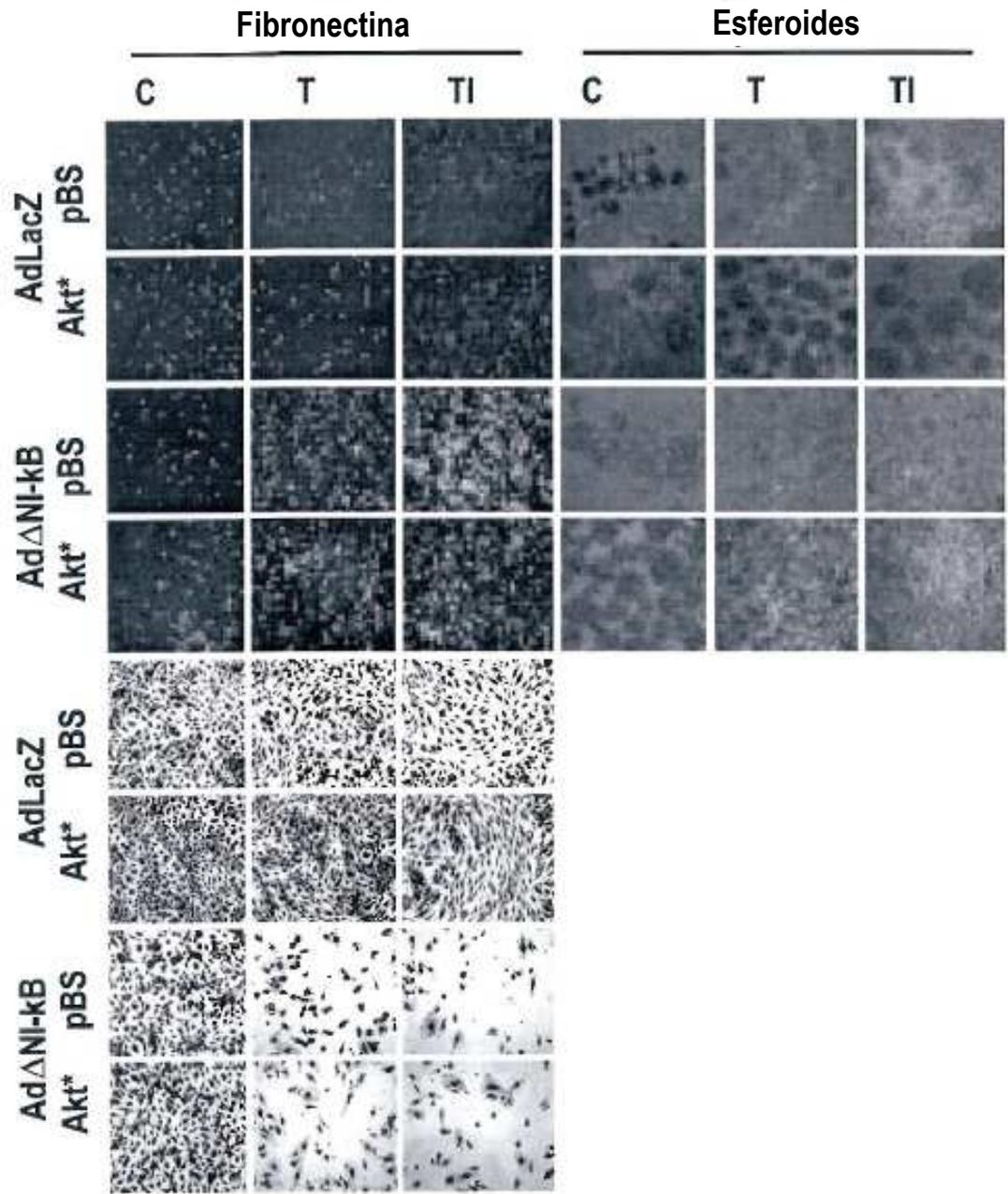


Fig. 4e

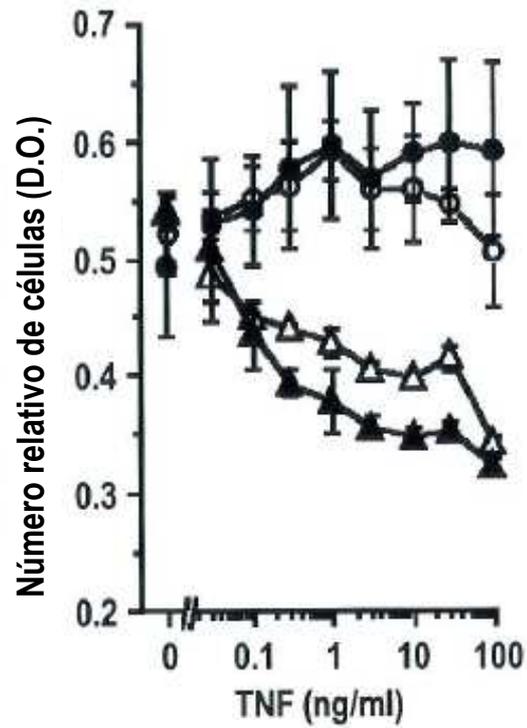


Fig. 4f

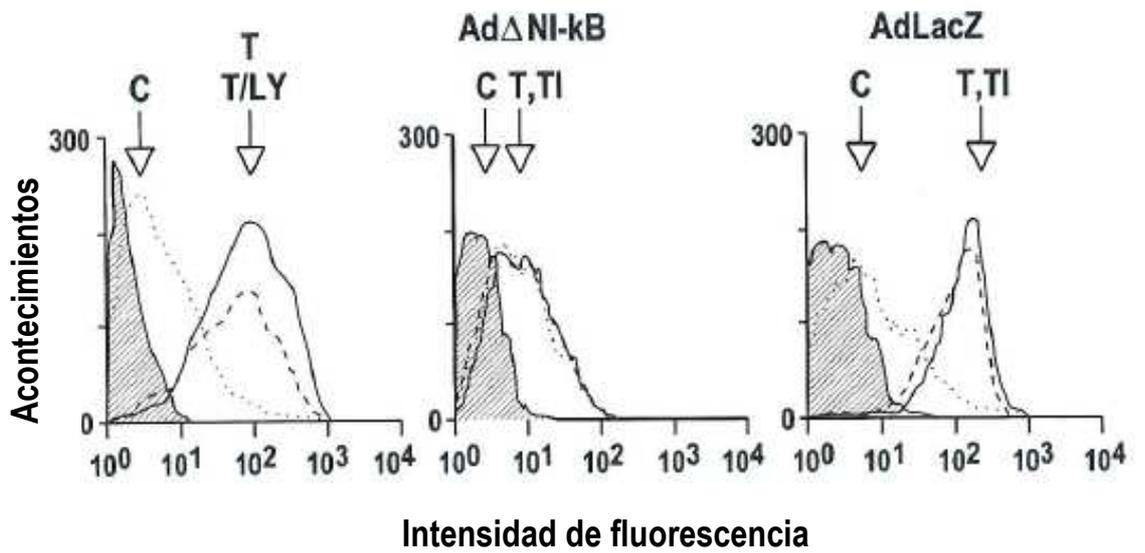


Fig. 5a

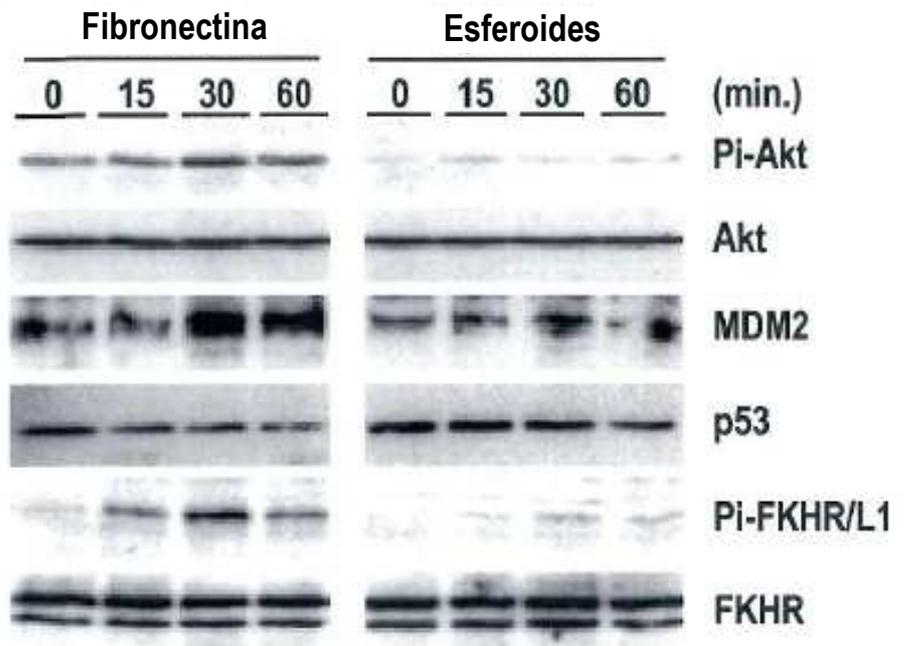


Fig. 5b

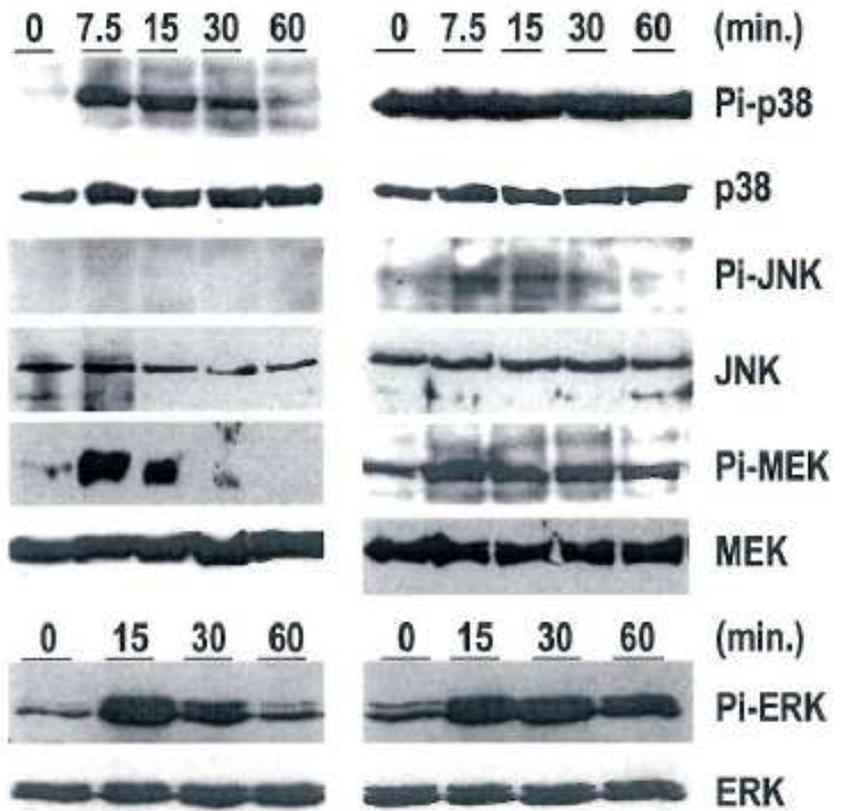


Fig. 6a

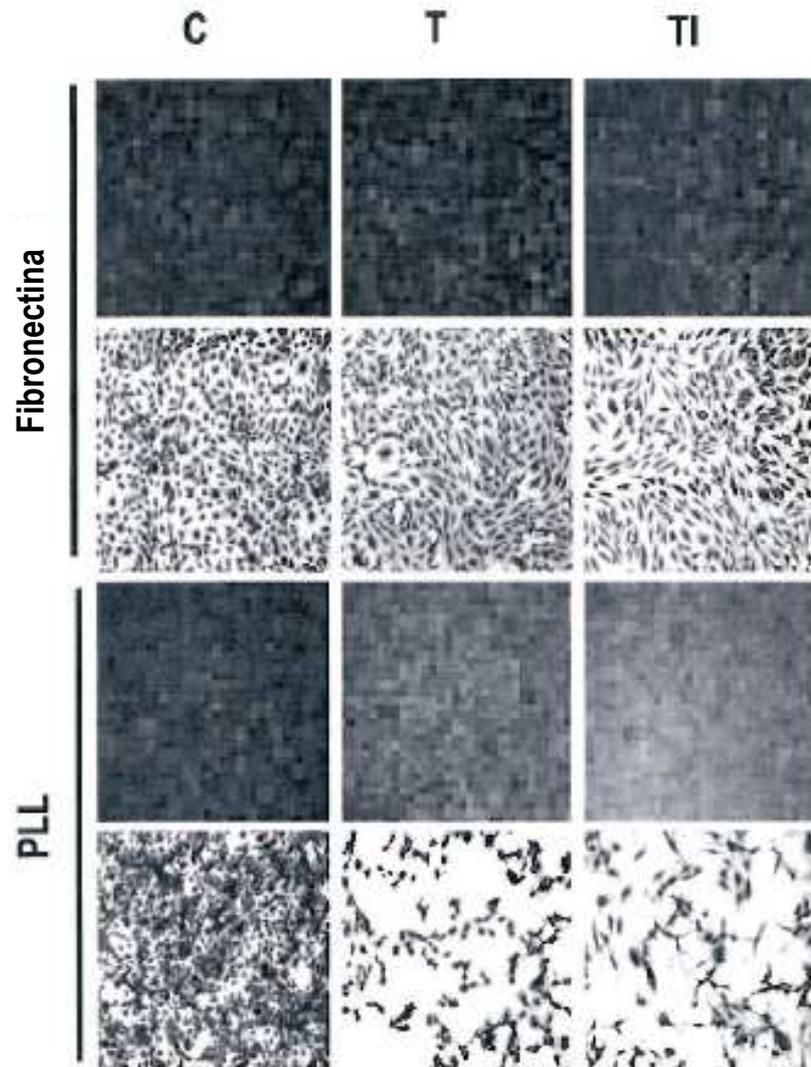


Fig. 6b

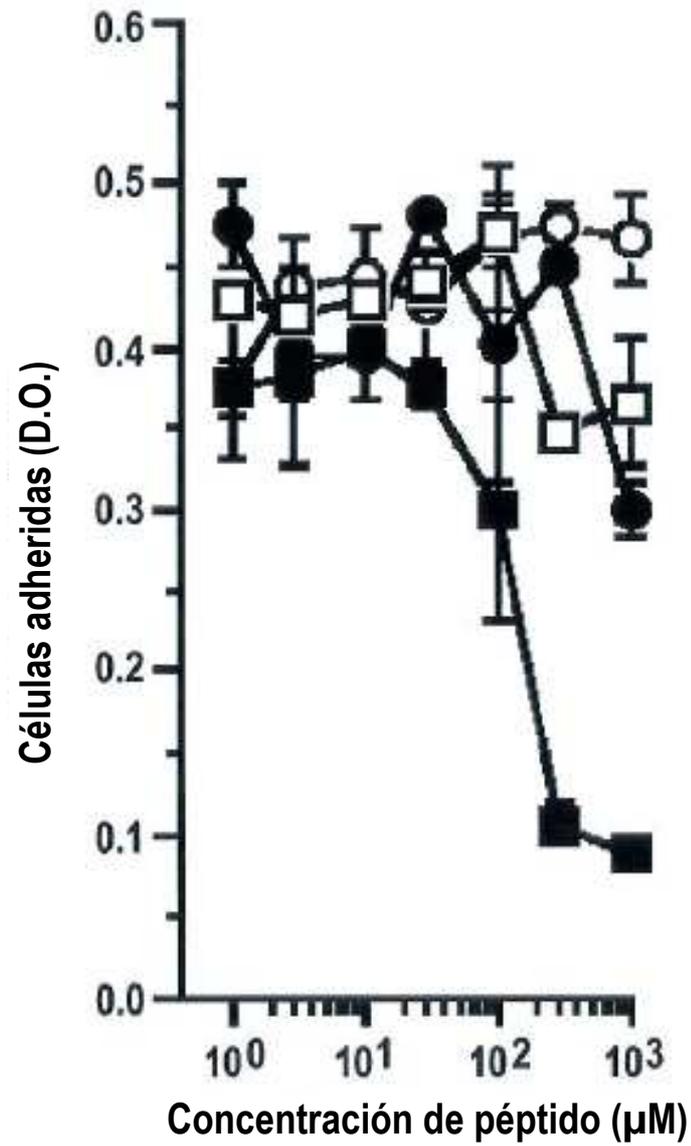


Fig. 6c

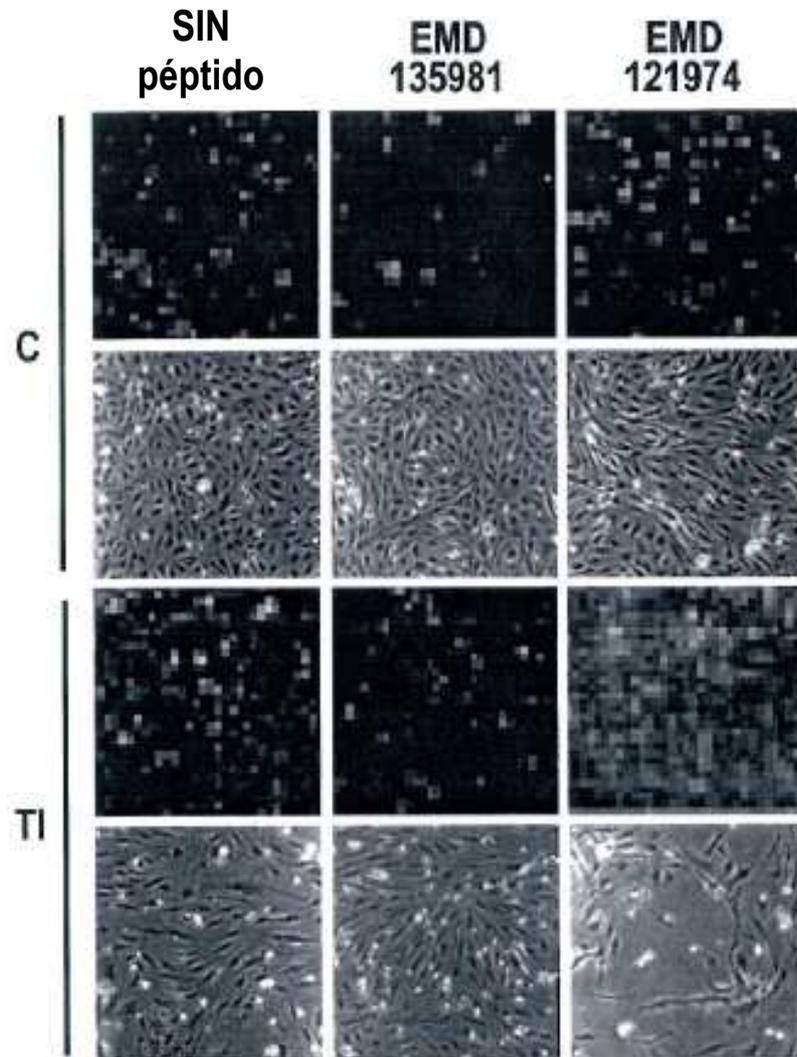


Fig. 6d

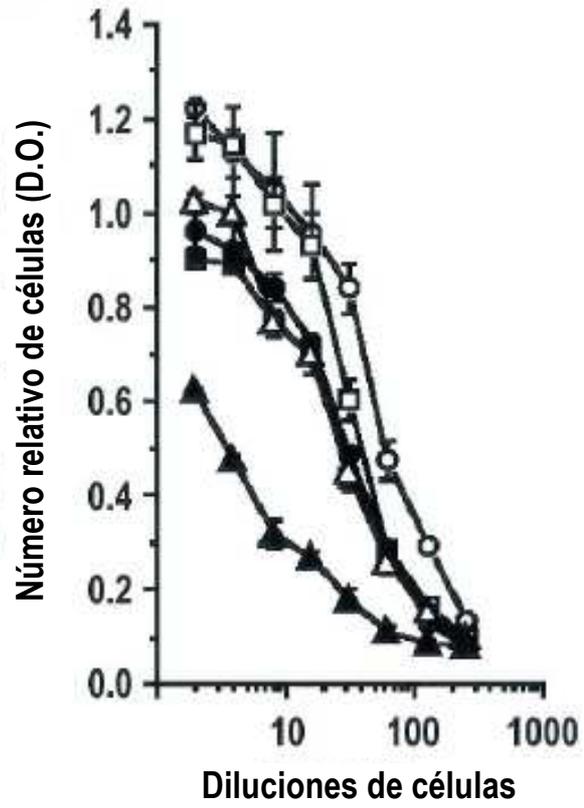


Fig. 6e

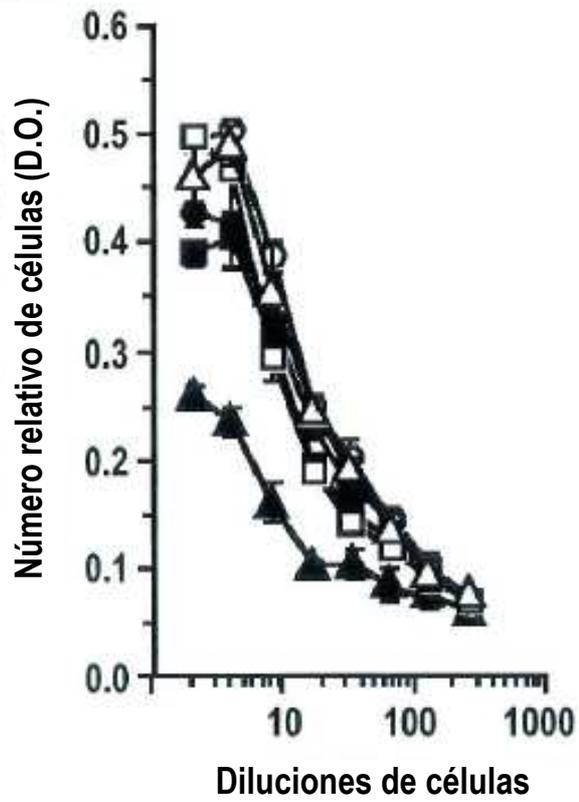


Fig. 7

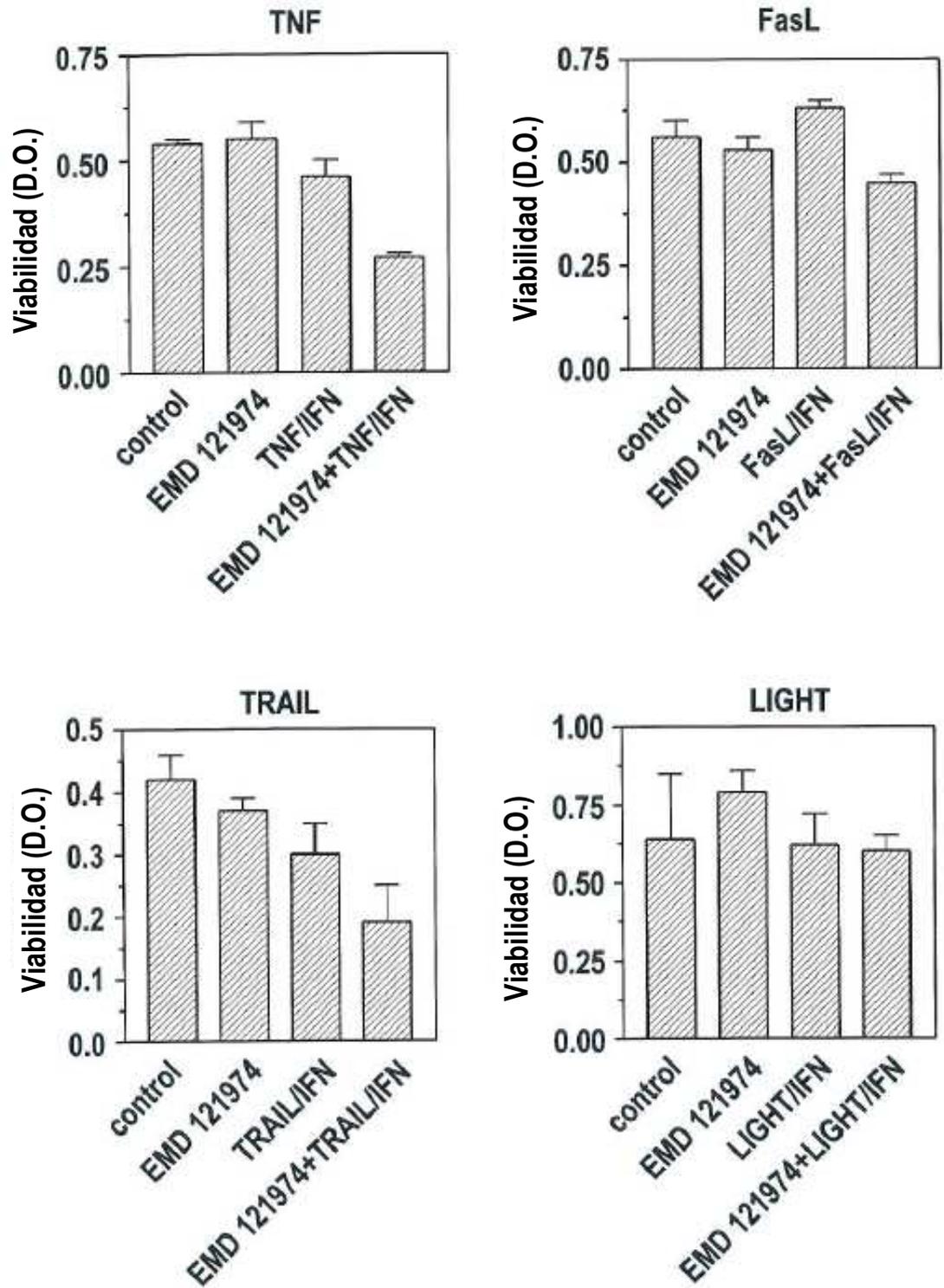


Fig. 8

