

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 556**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05744016 .6**
- 96 Fecha de presentación: **24.03.2005**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1755659**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **UTILIZACIÓN DE LA ANTICUERPOS ANTI-ALFA5BETA1 PARA INHIBIR LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS.**

30 Prioridad:  
 24.03.2004 US 556421 P  
 24.03.2004 US 556422 P  
 03.11.2004 US 625049 P  
 07.02.2005 US 651098 P  
 28.02.2005 US 657514 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.03.2012**

73 Titular/es:  
**Abbott Biotherapeutics Corp.**  
**1500 Seaport Boulevard**  
**Redwood City CA 94063, US**

72 Inventor/es:  
**RAMAKRISHNAN, Vanitha;**  
**BHASKAR, Vinay;**  
**HO, Sun;**  
**MURRAY, Richard y**  
**LAW, Debbie**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 376 556 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**

Utilización de los anticuerpos anti-alfa5beta1 para inhibir la proliferación de las células cancerosas.

**5 Campo de la invención**

La presente invención proporciona unas composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo que reconoce específicamente la integrina  $\alpha 5\beta 1$  expresada sobre la superficie de las células cancerosas y su utilización para inhibir la proliferación de dichas células cancerosas.

10

**Antecedentes de la invención**

La asociación de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  con la angiogénesis tumoral se encuentra bien establecida (ver, por ejemplo, la solicitud publicada de patente US nº 2002/0172675, presentada el 7 de mayo de 1999. La integrina  $\alpha 5\beta 1$  es una integrina heterodimérica que se une específicamente al ligando fibronectina. Se expresa sobre la superficie de las células endoteliales y media en la adhesión a la fibronectina y en la migración a la misma. La interacción de unión entre  $\alpha 5\beta 1$  y fibronectina se ha demostrado que resulta importante para la angiogénesis tumoral. La angiogénesis dentro de un tumor se inicia cuando la liberación de uno o más factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo FGF, VEGF, PDGF, etc.) activa localmente las células endoteliales. A continuación, estas células endoteliales activadas forman nuevos vasos sanguíneos mediante la unión, a través de su integrina  $\alpha 5\beta 1$ , a la fibronectina en la matriz extracelular. Se ha demostrado que los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  inhiben la angiogénesis en modelos tumorales *in vivo* (ver, por ejemplo, el documento US nº 2002/0172675 A1).

15

20

25

30

35

La terapia del cáncer antiangiogénesis se basa en la inhibición de la vascularización tumoral y, de esta manera, en la prevención del crecimiento tumoral continuado y la metástasis (para revisiones ver, por ejemplo, Marx, "A Boost for Tumor Starvation", *Science* 301:452, 2003; Sato, "Molecular Diagnosis of Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Cancer Therapy", *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200, 2003; Bissachi *et al.*, "Anti-Angiogenesis and Angioprevention: Mechanisms, Problems and Perspectives", *Cancer Detec. Prev.* 27:229, 2003). En la actualidad, más de 60 terapéuticos basados en la antiangiogénesis se encuentran en desarrollo clínico para el tratamiento del cáncer. Aunque en algunos cánceres puede resultar posible "someter a ayuno" a un tumor mediante la prevención de su vascularización, la investigación actual demuestra que existen cánceres que aparentemente no son vulnerables al tratamiento antiangiogénesis (ver Sato, *supra*). Por ejemplo, el terapéutico anticuerpo anti-VEGF AVASTIN<sup>TM</sup> (bevacizumab) ha tenido éxito en ensayos clínicos para el cáncer de colon, pero no para el cáncer de mama (ver Marx, *supra*). Además, los métodos terapéuticos basados en la antiangiogénesis no resultan muy adecuados para el tratamiento en un estadio temprano en el caso de que no se haya iniciado todavía el proceso de vascularización del tumor.

40

Debido a su acción en la angiogénesis, la integrina  $\alpha 5\beta 1$  ha sido propuesta como diana terapéutica para numerosas enfermedades mediadas por procesos angiogénesis, incluyendo el crecimiento tumoral canceroso. Se han desarrollado anticuerpos quiméricos y humanizados contra  $\alpha 5\beta 1$  que bloquean la unión específica a la fibronectina. Se ha demostrado que un anticuerpo quimérico de  $\alpha 5\beta 1$ , M200 (también conocido por su nombre genérico: volociximab) induce *in vitro* la apoptosis de las células endoteliales activadas con independencia del estímulo de factor de crecimiento.

45

De esta manera, siguen resultando necesarios terapias del cáncer y métodos de tratamiento en estadios tempranos que puedan destruir directamente las células cancerosas antes de que ni siquiera se haya iniciado el proceso de vascularización tumoral, o cuando una terapia focalizada antiangiogénesis haya demostrado su ineficacia.

50

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una formulación líquida que comprende:

55

1,0 a 15 mg/ml de anticuerpo antiintegrina  $\alpha 5\beta 1$ ,

22 mM a 28 mM de citrato;

135 mM a 165 mM de cloruro sódico;

60

polisorbato (Tween<sup>®</sup>) 80 al 0,04-0,06%;

y un pH de entre 6,3 y 6,7;

65

en la que la cadena pesada del anticuerpo presenta la secuencia siguiente:

QVQLKESGPGGLVAPSQSLSITCTISGFSLTDYGVHWVRQ  
 PPGKGLEWLVVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNSKKSQ  
 VFLIMNSLQTDSDAMYCARHGTYGMMTTTGDALDYWG  
 QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
 DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPS  
 CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV  
 EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL  
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

y en la que la cadena ligera del anticuerpo presenta la secuencia:

QIVLTQSPAIMASALGERVTMTCTASSSVSSNYLHWYQ  
 QKPGSAPNLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS  
 SMEAEDAATYYCHQYLRSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
 QSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY  
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

5

En una forma de realización preferida, la composición de la invención está destinada a la utilización en la inhibición de la proliferación de una célula cancerosa (o tumoral) que expresa integrina  $\alpha\beta 1$  sobre su superficie, comprendiendo la puesta en contacto de la célula tumoral con un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha\beta 1$  expresada sobre la superficie de la célula tumoral. En una forma de realización preferida, la célula tumoral se encuentra en un paciente con un tumor sólido refractario. En otra forma de realización preferida, la célula tumoral es de un cáncer seleccionado de entre el grupo constituido por: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma de células renales y cáncer de bazo.

10

15

En otra forma de realización, la composición de la invención está destinada a la utilización en la inducción de la muerte de una célula tumoral que expresa integrina  $\alpha\beta 1$  sobre su superficie, comprendiendo la puesta en contacto de la célula tumoral con un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha\beta 1$  expresada sobre la superficie de la célula tumoral. En una forma de realización preferida, la célula tumoral se encuentra en un paciente que presenta un tumor sólido refractario. En otra forma de realización preferida, la célula tumoral es de un cáncer seleccionado de entre el grupo constituido por cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma de células reales y cáncer de bazo.

20

25

En una forma de realización adicional, la composición de la invención está destinada a la utilización en la inhibición de la proliferación de una célula cancerosa en un paciente en el que la célula cancerosa expresa integrina  $\alpha\beta 1$  sobre su superficie. En esta forma de realización, la utilización comprende administrar en el paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo. En la presente memoria se describe un anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de M200 a la integrina  $\alpha\beta 1$  sobre la superficie de la célula cancerosa. El anticuerpo comprende una región variable con una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a las secuencias SEC ID nº 2, 4, 6 y 8. En una forma de realización preferida, el anticuerpo administrado en el paciente neutraliza por lo menos una actividad biológica de la integrina  $\alpha\beta 1$ . El anticuerpo administrado en el paciente puede comprender una fracción efectora terapéutica (por ejemplo un conjugado de anticuerpo-fármaco). En todavía otra forma de realización, el anticuerpo se administra en el paciente, en serie o conjuntamente con otro agente quimioterapéutico.

30

35

En otra forma de realización preferida, el anticuerpo se administra en un paciente que presenta un tumor sólido refractario, en serie o conjuntamente con otro agente quimioterapéutico.

En otra forma de realización, la composición de la invención está destinada a la utilización en el tratamiento de un sujeto que se sospecha que está desarrollado un cáncer que expresa  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie de sus células, en el que el sujeto todavía no ha desarrollado un tumor, comprendiendo la administración en el sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . En una forma de realización preferida, el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma de células renales y cáncer de bazo.

En otra forma de realización, la composición de la invención está destinada a la utilización en el tratamiento de un sujeto con una predisposición genética para un cáncer que expresa la  $\alpha 5\beta 1$  en la que el sujeto no ha desarrollado todavía un tumor que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . En una forma de realización preferida, el cáncer es seleccionado de entre el grupo constituido por cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de ovario, carcinoma de las células renales y cáncer de bazo.

Los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  preferidos que resultan útiles con los métodos descritos en la presente memoria comprenden IIA1, M200, F200 y anticuerpos que se unen específicamente al mismo epítipo sobre  $\alpha 5\beta 1$ , tales como IIA1, M200 y F200.

Los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  que resultan útiles con los métodos comprenden los anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de IIA1 y/o de M200 a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  expresada sobre la superficie de la célula tumoral.

Otros anticuerpos útiles con el método comprenden los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región variable sustancialmente idéntica a las secuencias SEC ID nº 2, 4, 6 y 8. También se describen anticuerpos que comprenden secuencias de aminoácidos de región variable con por lo menos aproximadamente 90%, 95%, 98% o preferentemente 99% o superior con las secuencias SEC ID nº 2, 4, 6 y 8.

En una forma de realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  formulados en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones farmacéuticas resultan útiles en los diversos métodos dados a conocer en la presente memoria. En diversas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva en un sujeto mediante diversas vías, que comprenden de manera no limitativa, las vías oral, subcutánea, tópica, intravenosa, intranasal, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, intraocular, intraventricular o intratecal. Una composición farmacéutica puede ser una formulación líquida que comprende entre aproximadamente 1,0 y 15 mg/ml de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ , citrato aproximadamente 22-27 mM, cloruro sódico aproximadamente 145-165 mM, polisorbato (Tween®) 80 aproximadamente al 0,04-0,06%, a un pH de entre aproximadamente 5,5 y 7,5. Otra composición farmacéutica puede ser una formulación líquida que comprende anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  aproximadamente 10 mg/ml, citrato aproximadamente 25 mM, cloruro sódico aproximadamente 150 mM, polisorbato (Tween®) 80 aproximadamente al 0,05%, con un pH de aproximadamente 6,5. En una forma de realización particularmente preferida, la composición farmacéutica es una formulación líquida que comprende aproximadamente 10 mg/ml de M200, aproximadamente 25 mM de citrato, aproximadamente 150 mM de cloruro sódico, polisorbato (Tween®) 80 a aproximadamente 0,05%, con un pH de aproximadamente 6,5. En otras formas de realización preferidas, cada una de las composiciones farmacéuticas de la invención puede comprender además un agente quimioterapéutico. La composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  puede administrarse en un paciente conjuntamente con una cantidad farmacéuticamente efectiva de otro agente quimioterapéutico.

Las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente pueden utilizarse en un método de tratamiento de un paciente con un diagnóstico o sospecha de diagnóstico de un cáncer seleccionado de entre el grupo constituido por: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma de células renales y cáncer de bazo, comprendiendo el método la administración por vía intravenosa en el paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación líquida que comprende entre aproximadamente 1,0 mg/ml y 15 mg/ml de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ , citrato aproximadamente 22-27 mM, cloruro sódico aproximadamente 145-165 mM, polisorbato (Tween®) 80 aproximadamente al 0,04-0,06%, a un pH de entre aproximadamente 5,5 y 7,5. En uno de los métodos de tratamiento, la dosis terapéuticamente efectiva administrada es aproximadamente 10 mg/kg. En una forma de realización preferida, el paciente tratado con la composición farmacéutica presenta un diagnóstico o una sospecha de diagnóstico de carcinoma de células renales o melanoma metastásico, y la dosis terapéuticamente efectiva es aproximadamente 10 mg/kg.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra: (A) las secuencias de ácidos nucleicos (SEC ID nº 1) y de aminoácidos (SEC ID nº 2) de  $V_H$  de IIA1; (B) las secuencias de ácidos nucleicos (SEC ID nº 3) y de aminoácidos (SEC ID nº 4) de  $V_L$  de IIA1.

La figura 2 ilustra: (A) las secuencias de ácidos nucleicos (SEC ID nº 5) y de aminoácidos (SEC ID nº 6) de V<sub>H</sub> de M200; (B) las secuencias de ácidos nucleicos (SEC ID nº 7) y de aminoácidos (SEC ID nº 8) de V<sub>L</sub> de M200.

### Descripción detallada de la invención

En aras de la claridad y una mejor comprensión, la exposición siguiente describe la invención en detalle mediante formas de realización ilustrativas y ejemplos. Las formas de realización y los ejemplos incluidos en la presente exposición no pretenden limitar el alcance de la invención. Resultará fácilmente evidente para el experto ordinario en la materia que pueden utilizarse materiales y/o métodos equivalentes, y/o que pueden realizarse cambios, variaciones o modificaciones evidentes en cualquiera de las formas de realización y ejemplos dados a conocer sin apartarse del alcance según las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos utilizados en la presente memoria presentan el significado ordinario común atribuido a ellos por el experto en la materia a la que se refiere la presente invención.

### Breve descripción general

La presente invención se basa en el inesperado descubrimiento de que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se expresa sobre la superficie de las células epiteliales tumorales en muchos tipos de cáncer. Además, se ha descubierto que la unión dirigida de anticuerpo a esta integrina  $\alpha 5\beta 1$  de superficie resulta en la destrucción directa de estas células cancerosas. Debido a que este método de ataque y destrucción de las células cancerosas es directo, es aplicable a un tratamiento en un estado muy temprano (es decir, antes de una formación sustancial de tumor). Además, el método directo de destrucción de células cancerosas puede resultar particularmente útil para tratar cánceres que expresan  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie celular pero que no han demostrado ser susceptibles a enfoques antiangiogénicos. Los cánceres en esta categoría comprenden de manera no limitativa cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer ovárico y melanoma metastásico.

En la presente memoria se describen métodos de destrucción o, de otro modo, de prevención de la proliferación, de células cancerosas mediante la utilización de anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ . En su forma más general, el método comprende poner en contacto una célula cancerosa que expresa  $\alpha 5\beta 1$  sobre su superficie con un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ , y de esta manera inducir la muerte (por ejemplo mediante apoptosis) de la célula cancerosa.

Los métodos pueden utilizarse para destruir células cancerosas *in vivo* (por ejemplo en un paciente) y de esta manera prevenir o atenuar la formación y crecimiento tumorales. Además, el método puede utilizarse para tratar tumores previamente formados, y puede utilizarse conjuntamente con otras terapias del cáncer (por ejemplo agentes quimioterapéuticos u otros agentes terapéuticos del cáncer de tipo molecular). Por ejemplo, un paciente que sufre de crecimiento de un tumor canceroso puede tratarse con una formulación del anticuerpo M200 en tándem con un compuesto quimioterapéutico, tal como doxorrubicina. Debido a que M200 es un anticuerpo quimérico con una toxicidad relativamente baja en el ser humano, este tratamiento de combinación podría proporcionar una potencia de eliminación de células cancerosas comparable pero sin los efectos secundarios de toxicidad asociados a una dosis más alta del quimioterapéutico solo.

En la presente memoria se describe un método en el que anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  destruyen y/o inhiben la proliferación de las células cancerosas directamente, incluso en ausencia de cualquier vascularización tumoral que podría ser susceptible al efecto antiangiogénico de estos anticuerpos. Por lo tanto, el método resulta particularmente adecuado para la profilaxis o el tratamiento terapéutico de cánceres que expresan  $\alpha 5\beta 1$  pero que no forman tumores altamente vascularizados y/o no son susceptibles a terapéuticos antiangiogénicos, por ejemplo cáncer pancreático, cáncer renal, melanoma metastásico, cáncer de pulmón y cáncer de mama.

Además, debido a la capacidad de eliminación directa de las células cancerosas de M200 (y de otros anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  dados a conocer en la presente memoria) resulta posible utilizar estos anticuerpos en la terapia del cáncer en una etapa temprana previamente a la formación de tumores vascularizados. Un método de tratamiento en una etapa temprana resulta particularmente significativo en vista de la aparición de nuevos ensayos diagnósticos más sensibles para cánceres que se han desarrollado con la información de marcadores genéticos obtenida de la secuencia del genoma humano. Es probable que muchos cánceres comunes sean detectados y diagnosticados en un estadio muy temprano, es decir, un estadio pretumoral en el que las células cancerosas podrían encontrarse presentes en el tejido y/o circulantes pero sin establecer una estructura tumoral detectable mediante diagnósticos no genéticos, que son menos sensibles. En dicho escenario de diagnóstico en una etapa temprana, las terapias antiangiogénicas podrían presentar un efecto reducido o nulo cuando todavía no se ha establecido una vascularización del tumor y los quimioterapéuticos habituales podrían crear excesivos efectos secundarios de toxicidad para justificar su utilización. Debido a que el método descrito en la presente memoria resulta en una eliminación directa dirigida por anticuerpos de las células cancerosas que expresan integrina  $\alpha 5\beta 1$  sobre su superficie resulta particularmente adecuado para el tratamiento preventivo en una etapa temprana.

Aquellos sujetos que más probablemente resultarían beneficiados por un método de tratamiento en un estadio temprano comprenden de manera no limitativa, 1) un sujeto en el que se han realizado ensayos pretumorales que indican una probabilidad elevada de desarrollo y/o presencia de tumores (o microtumores), 2) un sujeto expuesto a un ambiente carcinogénico muy potente cuya probabilidad de progresión tumoral es elevada, y 3) un sujeto que presenta una predisposición genética elevada a desarrollar un cáncer en el que las células cancerosas expresan  $\alpha 5\beta 1$  sobre su superficie.

Anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$

Los métodos descritos en la presente memoria utilizan anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  como agentes directos de eliminación de células cancerosas. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno particular, o que es inmunológicamente reactiva con el mismo, e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, manipulados genéticamente y otras formas modificadas de los mismos, que comprenden de manera no limitativa, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos) y fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, incluyendo, por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, rIgG y scFv. El término "scFv" se refiere a un anticuerpo Fv de una sola cadena en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera procedentes de un anticuerpo tradicional se han unido para formar una cadena. Además, el término "anticuerpo" tal como se utiliza en el contexto de la invención dado a conocer en la presente memoria comprende las mezclas de más de un anticuerpo reactivo con un antígeno específico (por ejemplo un cóctel de diferentes tipos de anticuerpo monoclonal reactivo con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ ).

Preferentemente, los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  utilizados en los métodos descritos en la presente memoria son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales útiles con los métodos pueden prepararse utilizando una amplia diversidad de técnicas conocidas de la técnica, incluyendo la utilización de técnicas de hibridoma, recombinantes y de expresión fágica, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales utilizando técnicas de hibridoma, incluyendo las conocidas de la técnica y que se enseñan en, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988; Hammerling *et al.*, en: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas", Elsevier, New York, 1981, páginas 563 a 681. La producción de anticuerpos mediante selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, ver, por ejemplo, Huse *et al.*, Science 246:1275-1281, 1989; Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989, y Vaughan *et al.*, Nature Biotech. 14:309-314, 1996, o mediante la inmunización de un animal con el antígeno o con ADN codificante del antígeno.

Pueden llevarse a cabo preferentemente los métodos directos de eliminación de células cancerosas utilizando los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  previamente caracterizados: IIA1, M200 ó F200. IIA1 es el anticuerpo parental de la clase IgG1 de ratón que se ha demostrado que inhibe la unión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  a la fibronectina (ver, por ejemplo, la solicitud publicada de patente US nº 2002/0172675 A1, presentada el 7 de mayo de 1999. M200 es un anticuerpo IgG4 quimérico derivado de IIA1. F220 es un fragmento Fab derivado de M200. Estos anticuerpos han sido generados, caracterizados funcionalmente y se han dado a conocer sus secuencias de aminoácidos específicas, en las patentes US nº de serie 10/724.274, presentada el 26 de noviembre de 2003, y nº 10/830.956, presentada el 23 de abril de 2004.

La cadena pesada del anticuerpo M200 presenta la secuencia de aminoácidos siguiente:

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTISGFS L TDYGVHWVRQPPGKGLE  
 WLVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNSKSQVFLIMNSLQTDDSA  
 MYYCARHGTY YGMTTGDALDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPL  
 APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL  
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYG  
 PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQED  
 PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
 NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
 YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

La cadena ligera del anticuerpo M200 presenta la secuencia de aminoácidos siguiente:

QIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSNYLHWYQQKPGSAPN  
 LWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQY  
 LRSPTFTGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN  
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK  
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 Se ha demostrado que tanto M200 como F200 muestran eficacia antiangiogénica *in vivo* en modelos de ojo de mono y de ojo de conejo (ver las solicitudes de patente US nº de serie 10/724.274, presentada el 26 de noviembre de 2003, y nº 10/830.956, presentada el 23 de abril de 2004).

10 Los anticuerpos que resultan útiles con el método descrito en la presente memoria también comprenden los que se unen específicamente al mismo epítipo sobre  $\alpha 5\beta 1$ , tales como IIA1, M200 y F200. Un "epítipo" (o "determinante antigénico") se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítipos pueden estar formados tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de la proteína. Por ejemplo, el epítipo en la integrina  $\alpha 5\beta 1$  puede comprender aminoácidos en cada una de las cadenas de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  que forman la estructura de heterodímero. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se conservan tras la exposición a solventes desnaturalizantes, mientras que los epítipos formados mediante plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con solventes desnaturalizantes.

15 Un epítipo típicamente incluye por lo menos 3, y más habitualmente, por lo menos 5 ó 6 a 10 aminoácidos en una conformación espacial única. Entre los métodos de determinación de la conformación espacial de epítipos se incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, Glenn E. Morris, editor, 1996.

20 Se cree que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo de una proteína en el caso de que las mutaciones de aminoácidos en la proteína que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo también reduzcan o eliminen la unión del otro anticuerpo. Además, puede concluirse que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo en el caso de que dos anticuerpos compitan para la unión a la proteína, es decir, la unión de un anticuerpo a la proteína inhibe, reduce o elimina competitivamente la unión del otro anticuerpo. En consecuencia, los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo con un anticuerpo que se ha determinado que inhibe competitivamente la unión de IIA1, M200 (volociximab), o F200 a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  expresada sobre la superficie de la célula cancerosa.

30 Los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  que resultan útiles con los métodos descritos en la presente memoria no se encuentran limitados a IIA1, M200 y F200, sino que pueden incluirse anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de región variable, de región marco o de CDR sustancialmente idéntica a las de IIA1, M200 y F200. La longitud de las regiones variables, de las regiones marco y de las CDR son bien conocidas por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5a edición, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Tal como se utiliza en la presente memoria, la región variable de la cadena pesada ("V<sub>H</sub>" o "VH") o de la cadena ligera ("V<sub>L</sub>" o "VL") de un anticuerpo incluye las cadenas pesadas o ligeras de un fragmento de unión a antígeno, por ejemplo Fv, scFv, dsFv o Fab. Las regiones variables de cadena ligera y pesada de anticuerpo también contienen cuatro regiones "de marco" interrumpidas por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las CDR son las responsables principales de la unión de un epítipo de un antígeno.

40 Una región variable, constante, de marco "sustancialmente idéntica", o CDR, se refiere a una región de un anticuerpo en la que por lo menos aproximadamente 85% a 90%, y preferentemente por lo menos 95% de la secuencia de aminoácidos, es idéntica a la región variable o constante de anticuerpo natural o no alterado. Los términos "idéntico" o porcentaje "de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de aminoácidos o de nucleótidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que presentan un porcentaje especificado de residuos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, una identidad de aproximadamente 60%, preferentemente de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior en una región especificada, alineadas y comparadas para correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación o región designada) medido utilizando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros por defecto indicados posteriormente, o mediante alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, la descripción de BLAST en el sitio de internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI), en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

55 Entre las secuencias idénticas o sustancialmente idénticas se incluyen las secuencias que presentan deleciones y/o adiciones, así como aquéllas que presentan sustituciones, así como las variantes naturales, por ejemplo las variantes polimórficas o alélicas, y las artificiales, tales como las variantes modificadas conservadoramente. Los algoritmos bien conocidos para la medición de la identidad de secuencias pueden tomar en consideración huecos y similares. Preferentemente, existe identidad de secuencias en una región que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos, o más preferentemente a lo largo de una región que presenta una longitud de 50 a 100 aminoácidos o nucleótidos.

Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  que resultan útiles con los métodos descritos en la presente memoria no se confinan a las secuencias observadas en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener características deseadas utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Dichos "anticuerpos alterados genéticamente" comprenden aquellos en los que se ha modificado la secuencia de aminoácidos respecto a la de un anticuerpo parental (es decir, no alterado). Las posibles variaciones varían entre modificar únicamente uno o unos cuantos aminoácidos, al rediseño total de, por ejemplo, la región variable o constante. Pueden realizarse cambios mediante mutación sitio-dirigida en la región constante con el fin de mejorar o alterar las características funcionales de un anticuerpo terapéutico, tales como la inmunogenicidad, las características farmacocinéticas (por ejemplo la vida media en suero), la fijación del complemento, la interacción con membranas y otras funciones efectoras. Generalmente, pueden realizarse cambios en la región variable del anticuerpo con el fin de mejorar las características de unión a antígeno.

Preferentemente, puede utilizarse el anticuerpo quimérico M200 en los métodos directos de eliminación de células cancerosas. La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a una molécula de inmunoglobulina en la que: (a) la región constante, o una parte de la misma, ha sido alterada, sustituida o intercambiada de manera que el sitio de unión a antígeno (región variable) se encuentra unida a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o a una molécula completamente diferente que proporciona nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo un enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc., o (b) la región variable, o una parte de la misma, ha sido alterada, sustituida o intercambiada por una región variable que presenta una especificidad de antígeno diferente o alterada. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son bien conocidos por el experto ordinario en la materia. Ver, por ejemplo, Morrison *et al.*, Science 229:1202-1207, 1985; Oi *et al.*, BioTechniques 4:214-221, 1986; Gillies *et al.*, J. Immunol. Methods 125:191-202, 1989; y las patentes US nº 5.807.715, nº 4.816.567 y nº 4.816.397.

También pueden utilizarse anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  humanizados para los métodos directos de eliminación de células cancerosas. Las secuencias humanas adicionales en los anticuerpos humanizados reducen adicionalmente la posible inmunogenicidad del anticuerpo al utilizarse como terapéutico en el ser humano. Se dan a conocer versiones humanizadas de IIA1 en las solicitudes publicadas de patente US nº 10/724.274, presentada el 26 de noviembre de 2003 y nº 10/830.956, presentada el 23 de abril de 2004. La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina que comprende un marco humano, por lo menos uno y preferentemente todas las CDR de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, presenta una identidad de por lo menos aproximadamente 85% a 90%, y preferentemente de por lo menos 95%. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias nativas de inmunoglobulina humana. Por lo tanto, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. Los residuos de marco en las regiones de marco humanas pueden sustituirse por el residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR, alterando, preferentemente mejorando, la unión de antígeno. Estas sustituciones de marco pueden identificarse mediante métodos bien conocidos de la técnica, por ejemplo mediante modelado de las interacciones de la CDR y los residuos de marco con el fin de identificar los residuos de marco importantes para la unión de antígeno y mediante la comparación de secuencias para identificar los residuos de marco no habituales en posiciones concretas. Ver, por ejemplo, Queen *et al.*, patentes US nº 5.530.101, nº 5.585.089, nº 5.693.761, nº 5.693.762 y nº 6.180.370. Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una diversidad de técnicas conocidas en la materia, entre ellas, por ejemplo, la injertación de CDR (patente EP nº 239.400, la publicación de patente PCT nº WO 91/09967, y las patentes US nº 5.225.539, nº 5.530.101 y nº 5.585.089), el recubrimiento o renovación superficial (patentes EP nº 592.106 y nº 519.596; Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498, 1991; Studnicka *et al.*, Prot. Eng. 7:805-814, 1994; Roguska *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973, 1994) y la reorganización de cadenas (patente US nº 5.565.332).

Pueden utilizarse anticuerpos humanos (es decir, anticuerpos que comprenden una región variable y una región constante humanas) contra  $\alpha 5\beta 1$  para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos según los métodos descritos en la presente memoria. Pueden prepararse u obtenerse anticuerpos humanos mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica, incluyendo métodos de expresión fágica indicados anteriormente, utilizando bibliotecas de anticuerpos derivadas a partir de secuencias de inmunoglobulina humana. Ver las patentes US nº 4.444.887 y nº 4.716.111, y las publicaciones de patente PCT nº WO 98/46645, nº WO 98/50433, nº WO 98/24893, nº WO 98/16654, nº WO 96/34096, nº WO 96/33735 y nº WO 91/10741. También pueden producirse anticuerpos humanos utilizando ratones transgénicos que puedan expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que puedan expresar genes de inmunoglobulina humana. Para una descripción general de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos, ver Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93, 1995. Para un comentario detallado sobre esta tecnología de producción de anticuerpos humanos y de anticuerpos monoclonales humanos y sobre los protocolos para producir estos anticuerpos, ver, por ejemplo, las publicaciones de patente PCT nº WO 98/24893, nº WO 92/01047, nº WO 96/34096 y nº WO 96/33735, la patente europea nº 0 598 877, y las patentes US nº 5.413.923, nº 5.625.126, nº 5.633.425, nº 5.569.825, nº 5.661.016, nº 5.545.806, nº 5.814.318, nº 5.885.793, nº 5.916.771 y nº 5.939.598. También pueden generarse anticuerpos totalmente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado, utilizando una técnica denominada "de selección guiada". En este enfoque, se utiliza un anticuerpo monoclonal no



humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo totalmente humano que reconozca el mismo epítipo (Jespers *et al.*, *Biotechnology* 12:899-903, 1988).

Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos primatizados (es decir, un anticuerpo que comprenda regiones variables de mono y regiones constantes humanas) para el tratamiento terapéutico según los métodos descritos en la presente memoria. Los métodos para producir anticuerpos primatizados son conocidos de la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.658.570, nº 5.681.722 y nº 5.693.780.

#### Función de anticuerpo

Los métodos en la presente memoria utilizan anticuerpos funcionales que muestran una unión específica a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . El ensayo de avidéz de los anticuerpos para la unión específica a antígenos permite al experto en la materia identificar anticuerpos que reconocen específicamente uno o más epítopos de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Los anticuerpos se define que presentan unión específica en el caso de que: 1) muestren un nivel umbral de actividad de unión, y/o 2) no presenten reacciones cruzadas en grado significativo con moléculas polipeptídicas relacionadas.

En primer lugar, los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  que resultan útiles para los métodos dados a conocer en la presente memoria se unen específicamente (o "reaccionan específicamente" o "inmunorreaccionan específicamente") en el caso de que se unan a un polipéptido, péptido o epítipo de integrina  $\alpha 5\beta 1$  con una afinidad de unión ( $K_a$ ) de  $10^6$  moles<sup>-1</sup> o superior, preferentemente de  $10^7$  moles<sup>-1</sup> o superior, más preferentemente de  $10^8$  moles<sup>-1</sup> o superior, y todavía más preferentemente de  $10^9$  moles<sup>-1</sup> o superior. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser fácilmente determinada por el experto ordinario en la materia, por ejemplo mediante análisis de Scatchard (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660-72, 1949) o mediante resonancia de plasmón superficial utilizando BIAcore. Se da a conocer una diversidad de ensayos de unión de anticuerpo que resultan útiles para caracterizar los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  en las solicitudes de patente US nº de serie 10/724.274, presentada el 26 de noviembre de 2003, y nº 10/830.956, presentada el 23 de abril de 2004.

En segundo lugar, los anticuerpos se unen específicamente en el caso de que no presenten reacciones cruzadas en grado significativo con polipéptidos relacionados. Los anticuerpos no presentan reacciones cruzadas en grado significativo con moléculas polipeptídicas relacionadas en el caso de que, por ejemplo, detecten el polipéptido integrina  $\alpha 5\beta 1$  pero no reconozcan polipéptidos relacionados conocidos según un análisis estándar de transferencia western (ver, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", editores, Ausubel *et al.*, 1995). Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos comprenden ortólogos, proteínas de la misma especie que son miembros de la familia de la integrina de proteínas, o polipéptidos integrina  $\alpha 5\beta 1$  mutantes en los que la mutación altera el epítipo anti- $\alpha 5\beta 1$ . Además, los anticuerpos pueden "cribarse frente a" polipéptidos relacionados conocidos con el fin de aislar una población que se una específicamente a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Por ejemplo, los anticuerpos generados contra polipéptidos de integrina  $\alpha 5\beta 1$  humana se adsorben a polipéptidos relacionados adheridos a la matriz insoluble; los anticuerpos específicos para los polipéptidos de integrina  $\alpha 5\beta 1$  humana fluirán por la matriz bajo las condiciones tamponadoras adecuadas. Este tipo de cribado permite aislar anticuerpos policlonales y monoclonales sin reactividad cruzada con polipéptidos estrechamente relacionados (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (editores), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan *et al.* (editores), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). El cribado y el aislamiento de anticuerpos específicos es bien conocido de la técnica (ver *Fundamental Immunology*, Paul (editores), Raven Press, 1993; Getzoff *et al.*, *Adv. in Immunol.* 43:1-98, 1988; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Goding, J.W. (editores), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 2:67-101, 1984). Los ejemplos representativos de dichos ensayos comprenden la inmunoelectroforesis concurrente, el radioinmunoensayo, la radioinmunoprecipitación, el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), el ensayo de transferencia por puntos o de transferencia western, el ensayo de inhibición o de competición y el ensayo de tipo sándwich. Para una revisión de los procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo, ver *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Terr, editores, 7a edición, 1991).

Pueden prepararse anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  de unión específica que resultan útiles con los métodos descritos en la presente memoria mediante un procedimiento de selección para la unión de  $\alpha 5\beta 1$ . Generalmente, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales preparados para unirse específicamente a una proteína particular, o a sus variantes polimórficas, alelos, ortólogos, variantes modificadas conservadoramente, variantes de procesamiento, con el fin de obtener únicamente los anticuerpos que son específicamente inmunorreactivos con la proteína seleccionada (por ejemplo la integrina  $\alpha 5\beta 1$ ) y no con otras proteínas. La selección de la unión específica se consigue descartando los anticuerpos que presentan reacción cruzada con otras moléculas. Puede utilizarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar los anticuerpos específicamente reactivos con el polipéptido integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Por ejemplo, pueden utilizarse inmunoensayos ELISA de fase sólida para seleccionar los anticuerpos específicamente reactivos con la proteína (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988) para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica).

Conjugados de anticuerpo-fármaco

El método de eliminación de células cancerosas pueden utilizar un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  conjugado con una fracción efectora. La fracción efectora puede ser cualquier número de moléculas, incluyendo fracciones de marcaje tales como marcajes radioactivos o marcajes fluorescentes, o preferentemente puede ser una fracción terapéutica. La fracción efectora (o "componente efector") puede unirse (o enlazarse, o conjugarse) con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  covalentemente, mediante una molécula conectora o un enlace químico, o no covalentemente, mediante enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno.

En un caso, la fracción terapéutica es una molécula de tamaño reducido que modula la actividad de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . En otro caso, la fracción terapéutica afecta a la actividad de las moléculas o células asociadas o muy próximas a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Por ejemplo, la fracción terapéutica puede ser un agente citotóxico. La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o bloquea el funcionamiento celular y/o provoca la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  y  $Re^{186}$ ), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas. Entre las toxinas adecuadas y los fragmentos correspondientes de las mismas se incluyen la cadena A diftérica, la cadena A de la exotoxina, la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la curcina, la crotina, la fenomicina, la enomicina, las auristatinas (por ejemplo las auristatinas E o F), y similares. El direccionamiento de la fracción terapéutica a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  expresada sobre la superficie de una célula cancerosa no sólo sirve para incrementar la concentración local de la fracción terapéutica en el área afectada por el cáncer, sino que también sirve para reducir los efectos perjudiciales que podrían encontrarse asociados a la fracción terapéutica.

Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos que pueden utilizarse como fracciones terapéuticas con los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  se incluyen, aunque sin limitación, adriamicina, doxorubicina, doxilo, epirubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL<sup>TM</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE<sup>TM</sup>, Rhone-Poulenc Rorer), taxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (ver la patente US nº 4.675.187), 5-FU, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, actinomicina D, VP-16, clorambucilo, melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se encuentran incluidas en esta definición los agentes hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores, tales como el tamoxifeno y la onapristona.

Alternativamente, puede llevarse a cabo el método de la presente memoria en el que los agentes quimioterapéuticos dados a conocer anteriormente se administran en una formulación conjuntamente con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  aunque no en forma de conjugado.

Indicaciones de cáncer

La presente exposición se refiere a métodos de eliminación de las células cancerosas, a la inhibición de la proliferación y/o metástasis de las células cancerosas, utilizando como diana para un anticuerpo la integrina  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie de la célula cancerosa. El cáncer es un estado fisiológico caracterizado típicamente porque las células experimentan un crecimiento no regulado. El cáncer incluye todos los neoplasmas malignos, que comprende de manera no limitativa, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de cánceres que expresan  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie celular que pueden ser objetivos utilizando los métodos dados a conocer en la presente memoria comprenden de manera no limitativa, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma de células renales y cáncer de bazo.

Un tumor es una masa proliferante de células que no presenta los controles normales del crecimiento. Un tumor puede ser benigno o maligno, y puede incluir células y tejidos precancerosos o cancerosos. Las células cancerosas típicamente forman tumores a medida que progresa el cáncer. El crecimiento tumoral es acompañado por un incremento de la densidad vascular. Esta neovascularización tumoral proporciona la alimentación necesaria para que los tumores puedan crecer. Los terapéuticos de anticuerpos antiangiogénicos anti- $\alpha 5\beta 1$  y anti-VEGF (VEGF=factor de crecimiento endotelial vascular) han demostrado ser eficaces para impedir el crecimiento tumoral en una diversidad de modelos de cáncer (ver, por ejemplo, Kim *et al.*, J. Clin. Invest. 110(7):933-41, 2002; Ferrara, Nat. Rev. Cancer 2(10):795-803, 2002). El anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  llamado M200 se ha demostrado que inhibe la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* en modelos de conejo y de mono de enfermedades oculares angiogénicas (por ejemplo la degeneración macular avanzada, ver la solicitud de patente US nº de serie 10/724.274, presentada el 26 de noviembre de 2003, y nº 10/830.956, presentada el 23 de abril de 2004).

La presente invención se basa en el inesperado descubrimiento de que para muchos tipos de cáncer, la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se expresa sobre la superficie de las células epiteliales tumorales (además de en las células endoteliales de la vascularización tumoral) y que la unión dirigida a esta integrina  $\alpha 5\beta 1$  de superficie con un anticuerpo resulta en la eliminación directa de estas células cancerosas. En consecuencia, los cánceres caracterizados por células epiteliales proliferativas que expresan  $\alpha 5\beta 1$  pueden tratarse y/o ser una diana de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  incluso

en ausencia de vascularización tumoral. Debido a que este método de ataque y eliminación de las células cancerosas es directo, permite un tratamiento en un estadio muy temprano (es decir, previamente a la formación sustancial de tumor).

5 Los pacientes que más probablemente se beneficiarán del método en una etapa temprana de tratamiento comprenden de manera no limitativa, 1) un paciente en el que los ensayos diagnósticos pretumorales han indicado una probabilidad elevada de desarrollo y/o presencia de tumores (o microtumores), 2) un paciente expuesto a un ambiente carcinogénico muy potente cuya probabilidad de progresión a tumor es elevada, y 3) un paciente cuya predisposición genética (por ejemplo la puesta de manifiesto por un marcador genético de cáncer) hace que la probabilidad de desarrollo de cáncer sea elevada, en el que las células cancerosas expresan  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie de las mismas. Por ejemplo, un paciente con una predisposición genética de cáncer de mama (por ejemplo positivo para el gen BRCA), o en el que se ha detectado algún marcador pretumoral de cáncer (por ejemplo micrometástasis detectadas mediante PCR), resulta particularmente adecuado para el método directo de eliminación de células cancerosas preventivo en etapa temprana en el que se administra una composición farmacéutica de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ .

Los genes que indican una predisposición incrementada al cáncer y los marcadores tumorales que indican una probabilidad de desarrollar un tumor pueden encontrarse en la literatura y bases de datos biomédicos del cáncer. Además, en la literatura biomédica se encuentran disponibles en la literatura biomédica bien conocida por el experto ordinario en la materia listas de carcinógenos y los niveles de exposición a los mismos que incrementan en gran medida el riesgo de cáncer. El experto ordinario en la materia puede utilizarse estos recursos de la literatura conjuntamente con métodos bien conocidos para detectar la expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  sobre las células de cáncer, dados a conocer posteriormente, para determinar si un sujeto podría someterse a los métodos de tratamiento del cáncer en estadio temprano. Tal como se describe en el Ejemplo 2, posteriormente, el análisis de citometría de flujo revela que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se expresa sobre la superficie de líneas celulares que se originan de por lo menos los cánceres siguientes: cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico y carcinoma de células renales.

Además, el método de eliminación directa de células cancerosas descrito en la presente memoria puede resultar particularmente útil para tratar cánceres que expresan  $\alpha 5\beta 1$  pero que no han demostrado susceptibilidad a los enfoques antiangiogénicos. Los cánceres en esta categoría comprenden de manera no limitativa, cáncer de vejiga, cáncer de mama, fibrosarcoma, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de pulmón y melanoma metastásico. Pueden utilizarse métodos particularmente preferidos para tratar cualquiera de los cánceres mencionados anteriormente en los que el paciente presenta tumores sólidos refractarios. El anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  llamado M200 (volociximab) ha demostrado cierta eficacia en el tratamiento de pacientes humanos con una diversidad de cánceres que manifiestan tumores sólidos refractarios, entre ellos: el cáncer colorrectal (CRC), el melanoma (MEL), el carcinoma de células renales (RCC), el cáncer hepatocelular (HCC), el cáncer de pulmón (NSCLC), el cáncer pancreático (PC), el cáncer de las parótidas (PARO) y el cáncer de mama (BC).

El experto ordinario en la materia podrá determinar los cánceres que expresan  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie de las células epiteliales tumorales mediante la utilización de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  (por ejemplo IIA1 ó M200) para sondear muestras de biopsia tumoral siguiendo métodos estándares de inmunohistoquímica. Tal como se describe en el Ejemplo 1, a continuación, el análisis inmunohistoquímico (IHC) de muestras de biopsia tumoral obtenidas de pacientes de melanoma, de cáncer de pulmón, pancreático y de mama ha mostrado expresión de integrina  $\alpha 5\beta 1$  sobre las células epiteliales tumorales. Resulta razonable esperar que se encontrarán otros cánceres que expresan  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie de las células epiteliales tumorales utilizando IHC (u otros métodos) y se reconoce que estos cánceres son susceptibles al método de eliminación de células cancerosas descrito en la presente memoria.

Además de la IHC de muestras de tumor, pueden cribarse líneas celulares de cáncer para la expresión en la superficie celular de  $\alpha 5\beta 1$  utilizando un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  y técnicas estándares de citometría de flujo bien conocidas por el experto ordinario en la materia. Tal como se detalla en el Ejemplo 2, a continuación, el cribado mediante citometría de flujo ha revelado que la expresión de  $\alpha 5\beta 1$  sobre la superficie de 21 líneas celulares de cáncer bien conocidas. Basándose en este resultado, estas líneas celulares son susceptibles a la eliminación celular directa utilizando anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  siguiendo los presentes métodos.

Además, en la medida en que una línea celular de cáncer se determina que expresa  $\alpha 5\beta 1$  sobre su superficie, y la línea celular corresponde, o se origina, o se deriva de células cancerosas presentes en un paciente de cáncer, pueden utilizarse los métodos de la presente exposición para tratar dicho paciente. Por ejemplo, la línea celular NW231, que se encontró en el Ejemplo 2 que expresaba la integrina  $\alpha 5\beta 1$  sobre su superficie, se originaba a partir de tumores de cáncer de mama. en consecuencia, el experto ordinario en la materia reconocerá inmediatamente que puede utilizarse un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  para tratar un paciente de cáncer de mama siguiendo los métodos que se enseñan en la presente memoria.

65

Composiciones, formulaciones y administración de anticuerpos

Los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  que resultan útiles en los métodos de la presente exposición pueden utilizarse en una forma aislada y purificada y ponerse en contacto directamente con células o tumores cancerosos. Los métodos de purificación de anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  (por ejemplo IIA1, M200 y F200) se dan a conocer en las solicitudes de patente US nº de serie 10/724.274, presentada el 26 de noviembre de 2003, y nº 10/830.956, presentada el 23 de abril de 2004. También puede prepararse F200 en forma de un fragmento Fab'-NAC según los métodos dados a conocer en la solicitud de patente US nº 60/583.127, presentada el 25 de junio de 2004. El F200-Fab'-NAC muestra una estabilidad incrementada en formulaciones líquidas y liofilizadas del anticuerpo. Puede determinarse la pureza y la homogeneidad utilizando técnicas estándares de química analítica. Un anticuerpo que sea la especie predominante presente en una preparación se considera que ha sido sustancialmente purificada. Por ejemplo, la solución de anticuerpo que muestre esencialmente una banda en un gel electroforético se encuentra sustancialmente purificada.

Preferentemente, el anticuerpo utilizado en las composiciones farmacéuticas de la invención presenta una pureza de por lo menos 85%, más preferentemente de por lo menos 95% y todavía más preferentemente de por lo menos 99%.

En las formas de realización preferidas, se lleva a cabo el método directo de eliminación de células cancerosas en el que los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  purificados se formulan en una composición farmacéutica que se administra en un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de una formulación o composición farmacéutica que resulta suficiente para curar, aliviar, atenuar o por lo menos detener parcialmente el cáncer y/o sus síntomas y/o complicaciones. Los métodos clínicos para determinar la cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  destinado al tratamiento de cánceres son bien conocidos por el experto ordinario en la materia y pueden determinarse empíricamente mediante experimentación rutinaria. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento del cáncer, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad capaz de producir uno o más de los efectos siguientes: (1) inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral, incluyendo el enlentecimiento y la detención completa del crecimiento, (2) reducción del número de células cancerosas, (3) reducción del tamaño tumoral, (4) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la infiltración de las células cancerosas en los órganos periféricos, (5) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la metástasis de las células cancerosas, (6) potenciación de la respuesta inmunológica anticáncer, y/o (7) alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados al trastorno.

Las composiciones farmacéuticas para la administración comprenden comúnmente un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  disuelto en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, preferentemente un portador acuoso. Son portadores, excipientes, estabilizadores aceptables para la composición farmacéutica aquellos que no resultan tóxicos para la célula o mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones utilizadas. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables comprenden tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN<sup>®</sup>, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS<sup>™</sup>. Puede utilizarse una diversidad de portadores acuosos, por ejemplo solución salina tamponada y similares. Estas soluciones deberían ser estériles y generalmente encontrarse libres de materias no deseables. Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse mediante técnicas convencionales bien conocidas de esterilización.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según resulte necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponadoras, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y otras sales farmacéuticamente aceptables, lo que implica que se incluyen sales de adición tanto de ácido como de base. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más de los siguientes: proteínas portadoras, tales como albúmina sérica; tampones; rellenos, tales como celulosa microcristalina, lactosa, almidón de maíz y otros almidones; agentes ligantes; edulcorantes y otros agentes saborizantes; agentes colorantes y polietilenglicol. La concentración del anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se selecciona principalmente basándose en los volúmenes de líquido, las viscosidades, el peso corporal y similares, según el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente (por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Science", 15a edición, 1980, y "The Pharmacological Basis of Therapeutics", de Goodman y Gillman, editores Hardman *et al.*, 1996).

En la presente invención, el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  se formula en forma de composición farmacéutica que comprende una solución de entre aproximadamente 1,0 mg/ml y 15,0 mg/ml de anticuerpo, citrato aproximadamente 22 a 28 mM, cloruro sódico aproximadamente 135 a 165 mM, polisorbato (Tween<sup>®</sup>) 80 al 0,04-0,06%, a un pH de entre aproximadamente 6,3 y 6,7. En una forma de realización particularmente preferida, la composición farmacéutica comprende una solución de aproximadamente 10 mg/ml de anticuerpo, citrato aproximadamente 25 mM, cloruro

sódico aproximadamente 150 mM, polisorbato (Tween®) 80 aproximadamente al 0,05%, a un pH de aproximadamente 6,5. En otras formas de realización, la composición farmacéutica de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  mencionada anteriormente puede comprender además un agente quimioterapéutico, o alternativamente, puede administrarse en un paciente conjuntamente con una cantidad farmacéuticamente efectiva de otro agente quimioterapéutico.

Preferentemente, la formulación líquida de la composición farmacéutica es una solución estable, incolora o transparente a ligeramente opalescente que muestra no más de 10%, y preferentemente 5% o menos de monómero anticuerpo degradado medido mediante SEC-HPLC.

Preferentemente, no se observa más de 10%, y preferentemente 5% o menos de "clipping" mediante hidrólisis, y se produce una agregación de anticuerpos no superior al 10%, y preferentemente de 5% o inferior. Preferentemente, la concentración, pH y osmolalidad de la formulación no cambian en más de  $\pm 10\%$ . La potencia es de entre 70% y 130%, preferentemente de entre 80% y 120% de la del control.

La administración de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  en un sujeto pueden llevarse a cabo de una diversidad de maneras, incluyendo, aunque sin limitación, por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, tópica, transdérmica, intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, rectal, intraocular, intraventricular o intratecal. Es conocido que los anticuerpos, al administrarse por vía oral, deben protegerse de la digestión. Lo anterior se consigue típicamente mediante acomplejamiento de las moléculas con una composición para que sean resistentes a la hidrólisis ácida y enzimática, o mediante empaquetamiento de las moléculas en un portador apropiadamente resistente, tal como un liposoma o una barrera de protección. Los medios agentes protectores de la digestión son bien conocidos de la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una diversidad de formas de dosificación unitaria dependiendo del modo de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral comprenden de manera no limitativa, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas y pastillas.

La dosis exacta que debe utilizarse en una forma de realización particular de la invención dependerá del propósito del tratamiento, y podrá ser determinada por el experto en la materia utilizando técnicas bien conocidas (por ejemplo, Ansel *et al.*, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery", Lieberman, "Pharmaceutical Dosage Forms" (vols. 1 a 3, 1992), Dekker, ISBN 0824770846, 082476918X, 0824712692, 0824716981; Lloyd, "The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding", 1999, y Pickar, "Dosage Calculations", 1999). Tal como es conocido en la técnica, pueden resultar necesarios ajustes para la degradación del cáncer, la administración sistémica frente a localizada y la tasa de nueva síntesis de proteasas, así como la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, momento de la administración, interacciones entre fármacos y la gravedad de la condición, y que podrán ser determinados mediante experimentación rutinaria por el experto en la materia.

En una forma de realización de la presente invención, se administra una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  administrado en un paciente basándose en el peso de anticuerpo (en mg) en relación al peso corporal del paciente (en kg). De esta manera, los niveles de dosis preferidos comprenden por lo menos aproximadamente 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10,0 mg/kg y 15 mg/kg. Preferentemente, la dosis se administra en el paciente en forma de infusión intravenosa durante 1 hora. Pueden administrarse dosis adicionales durante un periodo de tiempo prolongado, de manera que se establezca en el paciente una concentración en suero estable. Por ejemplo, puede administrarse una infusión de 10 mg/kg una vez a la semana durante el curso de un año.

En una forma de realización preferida, el nivel y programación de la dosificación de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  se seleccionan para garantizar que la dosis produce una concentración en suero máxima inferior a las concentraciones en suero pico medias seguras que se observan en estudios farmacocinéticos llevados a cabo en monos (por ejemplo *Cynomolgus*). Por ejemplo, en monos *Cynomolgus*, el nivel pico medio de M200 a una dosis de 50 mg/kg tras 4 dosis semanales fue de 1.862  $\mu\text{g/ml}$  (intervalo de 1.000 a 2.606  $\mu\text{g/ml}$ ). Los monos no manifestaron toxicidad a estas concentraciones en suero. Además, o alternativamente, puede seleccionarse una dosis de manera que el nivel valle en suero valle sea  $> 1 \mu\text{g/ml}$ , la concentración que produce una inhibición de 80% de la unión de  $\alpha 5\beta 1$  a la fibronectina en un ensayo de actividad *in vitro*.

Según una forma de realización de la presente invención, se administra una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  en un paciente por vía intravenosa a una dosis fija, típicamente de entre aproximadamente 0,1 y 10 mg por paciente por día para la eliminación terapéutica de células cancerosas. En formas de realización en las que se administra la composición farmacéutica en un sitio aislado, tal como en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano, y no en el flujo sanguíneo, pueden utilizarse dosis fijas de entre 0,1 mg y hasta aproximadamente 100 mg por paciente y día. Resultan posibles dosis sustancialmente superiores para formas de realización en las que se desee la administración tópica. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidos o resultarán evidentes para el experto en la materia, por ejemplo en "Remington's Pharmaceutical Science" y "The Pharmacological Basis of Therapeutics", de Goodman y Gillman, *supra*.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la eliminación de células cancerosas de la invención pueden administrarse como parte de un tratamiento terapéutico o profiláctico. En un método terapéutico, la composición farmacéutica se administra en un paciente que ya sufre de un cáncer, en una cantidad suficiente para curar, o por lo menos para detener parcialmente el avance de la enfermedad y sus complicaciones. Generalmente, en un contexto de tratamiento terapéutico, el progreso de la terapia puede medirse como una reducción del tamaño tumoral o como una reducción de la tasa de crecimiento tumoral. Una cantidad adecuada para llevar a cabo lo anterior se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para dicha utilización dependerán de la gravedad del cáncer y del estado general de salud del paciente. Pueden utilizarse administraciones únicas o múltiples dependiendo de la dosis y frecuencia toleradas por el paciente.

Un método de tratamiento en un estadio temprano se dirige a prevenir o a enlentecer el desarrollo del cáncer en un sujeto en el que se sospecha que se desarrolla la enfermedad, o en un estadio muy temprano de la misma. La dosis particular necesaria para un tratamiento en estadio temprano dependerá de la condición médica e historial del paciente, del cáncer particular que se debe prevenir, así como de otros factores tales como la edad, el peso, el género, la vía de administración, la eficiencia, etc. También puede utilizarse un método de tratamiento en estadio temprano de modo profiláctico, por ejemplo en un paciente que previamente ha sufrido de cáncer, con el fin de prevenir una recurrencia del cáncer, o en un paciente que se sospecha que presenta una probabilidad significativa de desarrollar cáncer. Por ejemplo, un paciente con una predisposición genética para el cáncer de mama, en el que se ha detectado algún marcador pretumoral de cáncer (por ejemplo micrometástasis detectadas mediante PCR) resultará particularmente adecuado para el método de tratamiento en estadio temprano.

En una forma de realización alternativa de la presente invención, puede llevarse a cabo la eliminación directa de células cancerosas, en la que se administra un agente quimioterapéutico además del anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ . Los agentes quimioterapéuticos típicos que resultan útiles en la presente forma de realización se han dado a conocer anteriormente. Este método terapéutico de combinación puede resultar particularmente preferente en un contexto de tratamiento en estadio temprano o profiláctico, en el que el paciente no presenta síntomas de la enfermedad totalmente desarrollados. En este estadio temprano, o en un contexto preventivo, muchos pacientes podrían no estar de acuerdo en someterse a los efectos secundarios tóxicos que acompañan a la utilización de un agente quimioterapéutico estándar por sí solo. Mediante la administración de una dosis inferior del quimioterapéutico estándar conjuntamente con un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  relativamente no tóxico, el cáncer podría tratarse profilácticamente, o en un estadio muy temprano, con un régimen que resulta efectivo, aunque mucho más tolerable para el paciente.

Los ejemplos siguientes son proporcionados a título ilustrativo y no limitativo de la invención dada a conocer en la presente memoria.

### **Ejemplos**

#### Ejemplo 1: expresión de $\alpha 5\beta 1$ en muestras de tumor detectada mediante IHC

Se realizó un ensayo para la expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  mediante inmunohistoquímica (IHC) de muestras de biopsia tumoral obtenidas de pacientes de melanoma y de cáncer de pulmón, renal, pancreático o de mama.

#### *Materiales y métodos*

Se congelaron muestras de tejido congelado (obtenidas del Mayo Clinic o del Cleveland Clinic) en compuesto para corte a temperatura óptima (OCT) y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se fijaron secciones criostáticas de tejido ( $7\ \mu\text{m}$ ) en 75% acetona/25% etanol durante 1 minuto. Las muestras se incubaron con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  IIA1 de ratón ( $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) o con IgG1 de ratón de control (antitrinitrofenilo, clon de hibridoma de la ATCC nº 1B7.11) durante 30 minutos. Se detectó la unión de anticuerpo utilizando el anticuerpo secundario biotilado de cabra anti-IgG de ratón ( $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 minutos, Jackson ImmunoResearch) y se reveló utilizando el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) y DAB estable (diaminobencidina y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Research Genetics). La tinción se llevó a cabo utilizando un dispositivo de autotinción DAKO a temperatura ambiente.

#### *Resultados*

Tal como se muestra en la Tabla 1, prácticamente la totalidad de las secciones de tumor analizadas presentaron tinción positiva para  $\alpha 5\beta 1$  en la vascularización tumoral. Inesperadamente, una proporción significativa de muestras de tumor también mostró tinción positiva para la expresión de integrina  $\alpha 5\beta 1$  en el epitelio tumoral mismo. Estos resultados indican que un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  se dirigirá directamente a las células cancerosas además de a la neovascularización invasiva.

**Tabla 1:** resultados de la IHC de muestras de tumor teñidas con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  IIA1

Tipo de tumor (nº de muestras)	Vascularización del tumor					Epitelio del tumor				
	Neg.	1+	2+	3+	4+	Neg.	1+	2+	3+	4+
Renal (n=39)	2	2	13	18	4	27	8	4	0	0
Pancreático (n=32)	0	1	17	12	2	15	2	7	7	1
Pulmonar (n=39)	0	1	0	28	1	19	14	3	2	1
de colon (n=21)	2	2	3	8	6	19	0	1	1	0
Melanoma (n=19)	3	0	2	13	1	13	5	1	0	0
Metástasis omentales ováricas (n=4)	0	0	1	3	0	2	2	0	0	0
de vejiga (n=8)	0	0	4	3	1	5	2	1	0	0

5

Ejemplo 2: expresión de  $\alpha 5\beta 1$  en líneas celulares de cáncer detectada mediante citometría de flujo

Se sometió a ensayo un panel de 24 líneas celulares mediante citometría de flujo para la expresión de integrina  $\alpha 5\beta 1$  en la superficie celular. Tal como se muestra en la Tabla 2, estas 24 líneas celulares se originaron de una diversidad de cánceres diferentes, entre ellos: cánceres de vejiga, mama, colon, fibrosarcoma, pulmón, melanoma, páncreas, próstata, ovario, riñón y bazo.

10

*Materiales y métodos*

Se extrajeron células con EDTA 5 mM en Tris-HCl (pH 8,0) y se bloquearon mediante centrifugación en solución salina de Hank que contenía FBS inactivado por calor al 3%, suero de cabra normal al 1% (Sigma) y BSA al 1% a 4°C durante 5 minutos. Las células se incubaron durante 30 a 60 minutos a 4°C con el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$  de ratón, IIA1 (10  $\mu$ g/ml) en tampón FACS (PBS que contiene BSA al 0,1%). Se eliminó el exceso de anticuerpo monoclonal mediante centrifugación y las células se lavaron dos veces con tampón FACS previamente a la resuspensión en PE-anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón (Southern Biotech, dilución 1:400) durante 30 a 60 minutos a 4°C. Tras lavar las células, se resuspendieron en tampón FACS que contenía yoduro de propidio (1  $\mu$ g/ml). Se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) en un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson). La MFI de fondo era de ~5.

20

*Resultados*

25

Tal como se muestra en la Tabla 2, se observó una expresión en superficie detectable significativa de integrina  $\alpha 5\beta 1$  en 21 de las 24 líneas celulares evaluadas. Tres líneas celulares de cáncer, CHL-1, COLO357 y C32, mostraron valores de MFI que eran muy similares a los de fondo, indicando que la expresión de integrina  $\alpha 5\beta 1$  era baja o nula. Las 21 líneas celulares que expresaban integrina  $\alpha 5\beta 1$  en sus superficie deberían ser vulnerables a la eliminación celular directa con un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ . Además, el cáncer del que se originaron estas líneas celulares podría ser susceptible al tratamiento con un terapéutico de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ .

30

**Tabla 2:** resultados del análisis FACS de diversas líneas celulares e cáncer con IIA1, y ensayo de proliferación *in vitro* con M200

35

Línea celular	Cáncer de origen	Expresión superficial de $\alpha 5\beta 1$ (MFI)	% de inhibición del crecimiento	
			Suero -	Suero +
A549	Pulmón	71,41	40	0
H460	Pulmón	87,5	40	0
SW839	Renal	65,8	30	0
MIA PACA-2	Páncreas	61,9	20	0
HCT-116	Colon	42,5	15	0
786-0	Renal	144,4	10	0
EKVX	Pulmón	36,7	10	0
SW1990	Bazo	nd <sup>1</sup>	10	0
SN12C	Renal	129,1	5	0
A498	Renal	67,1	5	0

Tabla 2 (continuación)

Línea celular	Cáncer de origen	Expresión superficial de $\alpha 5\beta 1$ (MFI)	% de inhibición del crecimiento	
			Suero -	Suero +
A375	Melanoma	156,1	5	0
A2957	Melanoma	36,2	0	0
CHL-1	Melanoma	6,8	0	0
TK-10	Renal	36,6	0	0
COLO 357	Páncreas	7,8	0	0
HT144	Melanoma	102,1	0	0
C8161	Melanoma	122	0	0
HT1376	Vejiga	111,9	0	0
DU145	Próstata	87,5	0	0
UACC-62	Melanoma	88,5	0	0
HT1080	Fibrosarcoma	421,7	0	0
ES-2	Ovario	132,8	0	0
CAPAN-1	Páncreas	nd <sup>1</sup>	0	0
CAPAN-2	Páncreas	nd <sup>1</sup>	0	0
ASPC-1	Páncreas	nd <sup>1</sup>	0	0
C32	Melanoma	5,7	0	0
LOX	Melanoma	261,6	40 <sup>2</sup>	35
NW231	Mama	132,2	10 <sup>2</sup>	35

<sup>1</sup>nd=no determinado

<sup>2</sup>los valores de % de inhibición del crecimiento se determinaron en un ensayo de 2 días, y no de 4 días.

5

#### Ejemplo 3: inhibición con M200 de la proliferación *in vitro* de células cancerosas

Se evaluó un panel de 28 líneas de células cancerosas para sensibilidad al anticuerpo quimérico anti- $\alpha 5\beta 1$  M200 en un ensayo de proliferación celular en presencia o en ausencia de suero.

10

#### *Materiales y métodos*

Se sembraron en placa unas líneas de células cancerosas a una densidad de 2.500 células/pocillo en placas de 96 pocillos en IMDM con suplementos en presencia o en ausencia de FBS al 10%. En el momento de la siembra, las células se retaron con diversas concentraciones de M200 o con un anticuerpo anti- $\alpha 5$  no bloqueante de función, VC5. Cuatro días después se evaluó la viabilidad celular con el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los estudios del crecimiento se llevaron a cabo por lo menos 3 veces por triplicado.

15

#### *Resultados*

Tal como se muestra en la Tabla 2, M200 inhibió el crecimiento de trece líneas de células cancerosas en ausencia de suero y de dos líneas celulares en presencia de suero. Dos de las líneas celulares, LOX y NW231, se descubrió que eran sensibles a M200 bajo ambas condiciones. Basándose en estos resultados, los cánceres a partir de los que se originan dichas líneas celulares (melanoma y de mama) es probable que respondan al tratamiento con M200.

25

#### Ejemplo 4: inhibición *in vivo* de la proliferación de células tumorales en modelos de xenoinjerto de NW231 y de LOX

Se cultivaron células NW231 y LOX en forma de xenoinjertos ortotópicos en ratones SCID y se retaron con los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$  M200 e IIA1 mediante inyección intraperitoneal.

30

#### *Materiales y métodos*

Se obtuvieron ratones inmunocomprometidos CB-17 SCID (cepa C.B-Igh1/IcrTac-Prkdc) de Taconic Farms (Germantown, NY). Los estudios se iniciaron utilizando ratones hembra de edades comprendidas entre las 6 y 10 semanas (de ~20 gramos de peso). Los animales recibieron previamente dosis de M200, IIA1 o IgG de control por vía intraperitoneal a una dosis de 10 mg/kg, 1 hora antes de la inoculación de NW231 ( $1 \times 10^7$  células en IMDM) en una almohadilla de grasa mamaria. Se continuó con la dosificación durante 3 semanas a una frecuencia de 3 veces/semana a una dosis de 10 mg/kg. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana con un calibrador y se calculó como  $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$ . Se llevaron a cabo observaciones clínicas y de mortalidad diariamente siguiendo normas de la IACUC.

35

40



### Resultados

Se encontró que IIA1 inhibía reproduciblemente el crecimiento tumoral de los xenoinjertos de NW231 y de LOX en dicho modelo. No se encontró que M200 inhibiese reproduciblemente el crecimiento tumoral en dichos modelos. Debido a que IIA1 no reconoce la  $\alpha 5\beta 1$  de ratón en la vascularización tumoral del xenoinjerto, la totalidad del efecto inhibitor de IIA1 del crecimiento tumoral puede atribuirse a un efecto antiproliferativo directo sobre las células cancerosas del tumor.

#### Ejemplo 5: IIA1 en combinación con DOXIL® previene el establecimiento tumoral en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de NW231

Se llevó a cabo el experimento siguiente con el fin de determinar la eficacia del anticuerpo anti-integrina  $\alpha 5\beta 1$ , IIA1, en combinación con el agente quimioterapéutico DOXIL® en la prevención del establecimiento *in vivo* de tumores de NW231 en el ser humano. DOXIL® es una formulación encapsulada en liposomas de HCl de doxorubicina, un antibiótico antraciclina citotóxico aislado a partir de *Streptomyces peucetius*. La línea celular NW231 originada a partir de cáncer de mama se considera un buen modelo para el estudio de tratamientos para el cáncer de mama.

### Materiales y métodos

Se inocularon ratones SCID hembra de cuatro a seis semanas de edad obtenidos de Taconic Farms y mantenidos en jaulas Micro-isolator, con  $1 \times 10^7$  células NW231. Los animales recibieron control TIB (n=20) o M200 (n=20) a una dosis de 5 mg/kg en la primera inyección en el momento de la inoculación de células tumorales. Los tratamientos posteriores fueron de 0,7 mg/kg en cada inyección. Se inició el tratamiento de DOXIL® 5 días después de la inoculación de las células tumorales. Las dosis quimioterapéuticas fueron de 4 mg/kg en la primera inyección y de 2 mg/kg en las inyecciones posteriores. Los reactivos se administraron mediante inyección intraperitoneal en cuatro dosis. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana y se realizaron observaciones clínicas y de mortalidad diariamente según normas de la IACUC.

### Resultados

El tratamiento con IIA1 presentó un efecto significativo de retraso del establecimiento de los tumores de NW231 en ratones. Veinticuatro días después del implante de tumores de NW-231, el volumen medio tumoral de los xenoinjertos tratados con TIB de control se había incrementado de modo exponencial a  $\sim 425 \text{ mm}^3$ , mientras que los xenoinjertos tratados con IIA1 se habían agrandado hasta un volumen medio de  $\sim 175 \text{ mm}^3$ .

El tratamiento de DOXIL® por sí solo también mostró un efecto significativo de prevención del establecimiento tumoral. En el caso de los xenoinjertos tratados con solo DOXIL®, el volumen tumoral medio se incrementó inicialmente hasta sólo  $\sim 25 \text{ mm}^3$  durante los primeros 45 días posteriores al implante, y después se incrementó gradualmente hasta  $\sim 275 \text{ mm}^3$  alcanzado el día 74.

El tratamiento de los ratones con la terapia de combinación de IIA1 y doxilo presentó un efecto inhibitor todavía mayor sobre la tasa de establecimiento tumoral en comparación con cualquiera de los dos tratamientos por sí solo. En el caso de los xenoinjertos tratados con IIA1 más DOXIL®, el volumen tumoral medio siguió siendo de prácticamente cero hasta el día 54, y después se incrementó gradualmente hasta sólo  $\sim 125 \text{ mm}^3$ , alcanzados el día 74. Estos resultados indican una eficacia incrementada (es decir, un efecto inhibitor tumoral combinado) *in vivo* para el tratamiento combinado de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ , IIA1 y el agente quimioterapéutico DOXIL®.

#### Ejemplo 6: eficacia de M200 medida en un modelo de tumor VX2 de conejo

Aunque M200 no reacciona cruzadamente con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  de ratón o de rata, reconoce la integrina  $\alpha 5\beta 1$  presente en el conejo. De esta manera, el carcinoma VX2 de conejo podría representar un buen modelo para determinar la eficacia de la eliminación directa *in vivo* de células cancerosas de M200. VX2 es un modelo de conejo ampliamente aceptado para estudios sobre el tratamiento de los tumores primarios de diversas localizaciones (ver, por ejemplo, Chen J.G. *et al.*, Lab. Anim. 38(1):79-84, enero de 2004; Pudie T.G. *et al.*, Phys. Med. Biol. 46(12):3161-75, diciembre de 2000; Geschwind J.H. *et al.*, Cancer Res. 62(1):3909-3913, julio de 2002).

#### **A. Estudio piloto de M200 sobre VX2**

Se llevó a cabo un estudio piloto inicial para determinar los parámetros generales para llevar a cabo el estudio de eficacia de M200 en el modelo de tumor VX2 de conejo.

#### *Inoculación tumoral*

Se inocularon conejos el día 0 con una suspensión celular (100  $\mu\text{l}$ ) por vía subcutánea (pata trasera izquierda) y por vía intramuscular a una profundidad de aproximadamente 3 mm (pata trasera derecha). La inoculación intramuscular se llevó a cabo de la manera siguiente. Con el conejo bajo anestesia de quetamina/isoflurano, se realizó una incisión

de ~2 cm en paralelo al fémur derecho con un bisturí en el aspecto lateral anterior del eje femoral, ~1/3 de la longitud total del fémur distalmente respecto a la articulación femoro-pélvica (de la cadera). Se separaron los grupos musculares para crear una cavidad de ~0,5 cm de profundidad. Se introdujo un fragmento de tumor VX2 de un animal donante en la cavidad. Se cerró bien la piel con grapas o suturas quirúrgicas estériles y se aplicó un antibiótico tópico en el sitio de la herida.

#### *Mediciones de los tumores*

Desde el día 5, se midieron las dimensiones tumorales (longitud, anchura y altura) en milímetros con un calibrador Vernier electrónico conectado a un ordenador portátil con una frecuencia mínima de dos veces a la semana. Para mantener la consistencia, el mismo técnico formado llevó a cabo las mediciones de los tumores durante todo el curso del estudio. Se calculó el volumen tumoral utilizando la fórmula siguiente: longitud x anchura x altura x 0,52. Tras el sacrificio de los animales, se extirparon cuidadosamente los tumores, se trocearon y se pesaron. Además, los animales se pesaron un mínimo de una vez a la semana. Se conservaron muestras representativas de cada tumor en un casete de muestra en formalina u OCT y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

#### *Pases in vivo de tumores VX2*

Los tumores VX2 utilizados tanto en el estudio piloto como en el de eficacia de M200 se mantuvieron mediante pases *in vivo* realizados mensualmente. Se utilizó una suspensión celular (100 µl) o trozos de tumor (~5 a 10 mm<sup>3</sup>) para la inoculación intramuscular en cada pata trasera. Se realizó un seguimiento visual de los animales y de los tumores y estos se extrajeron antes de alcanzar un diámetro de 2 cm para los pases *in vivo*. Los pases *in vivo* se llevaron a cabo mediante el sacrificio del animal, extracción del tumor y procesamiento del mismo en trozos de 5 a 10 mm<sup>3</sup>. A continuación, se reimplantaron los trozos en el siguiente grupo de 2 conejos.

#### *Análisis IHC de tumores VX2 procedentes de conejos tratados con M200*

Se administró M200 por vía intravenosa a una dosis de 10 mg/kg en un conejo portador de un tumor y éste se extirpó 1 hora después. Las secciones de tumor se tiñeron con: (i) un anticuerpo secundario antihumano específico para M200 unido a tumor, (ii) IIA seguido de un anticuerpo secundario anticonejo para detectar la α5β1 total, o (iii) un IgG de control y un anticuerpo secundario antiratón.

#### *Resultados*

Tanto los tumores subcutáneos como los tumores intramusculares se descubrió que eran accesibles a M200 inyectado por vía intravenosa en los animales, según evaluación mediante IHC. El análisis de IHC de las secciones teñidas reveló niveles elevados de expresión de α5β1 tanto en células tumorales VX2 como en la vascularización tumoral del conejo.

#### **B. Estudio de eficacia de M200 sobre VX2**

Basándose en los resultados de IHC del estudio piloto, se utilizó el modelo de VX2 de conejo para evaluar la eficacia de M200 *in vivo*.

#### *Métodos*

Se inocularon conejos (30 en total), por vía subcutánea o intramuscular, con una suspensión celular de VX2 (100 µl) o con trozos de tumor (~5 a 10 mm<sup>3</sup>). El grupo de ensayo de 20 se trató con M200 a una dosis de 10 mg/kg por vía intravenosa, dos veces a la semana durante 3 semanas. El grupo de control de 10 animales se trató con una IgG de control administrada mediante el mismo método que M200. Las mediciones de los tumores, el sacrificio, las pesadas, la conservación de los tumores y la duración del estudio se realizaron según los métodos descritos anteriormente para el estudio piloto. Además, se extrajo un mililitro de sangre de un vaso de la oreja semanalmente para el análisis del suero.

#### *Resultados*

Se observó una fuerte correlación entre la inhibición del crecimiento tumoral y los niveles circulantes de M200 en los animales. En general, al mantener los niveles de M200 a 50 µg/ml o a un nivel superior, el crecimiento tumoral resultaba inhibido. Debido a que M200 es inmunogénico en los conejos, algunos de los conejos del grupo de ensayo generó una respuesta inmunológica a M200 incluso dos semanas después de la administración de M200, y finalmente se descubrió que la totalidad de los animales se había seroconvertido. En los animales del grupo de ensayo que generaron una respuesta antiidiotipo resultante en la eliminación de M200 (es decir, M200 < 50 µg/ml el día 14), se observó una mayor crecimiento tumoral. De esta manera, los resultados observados con el modelo de carcinoma VX2 indican que M200 puede inhibir el crecimiento tumoral en un modelo oncológico *in vivo* robusto.

Ejemplo 7: eficacia de M200 y de IIA1 en un modelo de xenoinjerto de VX2 en ratones SCID

Tal como se ha descrito en el Ejemplo 6, M200 mostró eficacia en un modelo de carcinoma VX2 de conejo. Se realizó una medida adicional de la capacidad de eliminación directa de células cancerosas de M200 y de IIA2 en un modelo de xenoinjerto de VX2 en ratones SCID. Debido a que M200 e IIA1 no reconocen la integrina  $\alpha 5\beta 1$  de ratón presente en la vascularización tumoral del xenoinjerto de VX2, cualquier efecto de inhibición del crecimiento tumoral del xenoinjerto de VX2 podría atribuirse a un efecto antiproliferativo directo que presentan M200 e IIA1 sobre las células de cáncer VX2.

*Materiales y métodos*

Se obtuvieron ratones inmunocomprometidos CB-17 SCID (cepa C.B-Igh1/IcrTac-Prkdc) de Taconic Farms (Germantown, NY). Se iniciaron estudios utilizando ratones hembra de edades comprendidas entre 6 y 10 semanas (de ~20 gramos de peso). Los animales recibieron dosis previas de M200, IIA1 o IgG de control por vía intraperitoneal a una dosis de 10 mg/kg una hora antes de la inoculación de VX2 ( $1 \times 10^7$  células en medio de Dulbecco modificado por Iscove) en la almohadilla de grasa mamaria. Se continuó la dosificación durante 3 semanas a una frecuencia de 3 veces/semana a una dosis de 10 mg/kg. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana con un calibrador y se calculó como  $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$ . Se llevaron a cabo observaciones clínicas y de mortalidad diariamente según normas de la IACUC.

*Resultados*

La dosificación con M200 o IIA1 no se correlacionó con una tasa reducida de crecimiento tumoral de VX2 o con un tamaño tumoral globalmente reducido frente a ratones dosificados con IgG de control. Estos resultados sugieren que ni M200 ni IIA1 pueden eliminar directamente las células de VX2 en el modelo de xenoinjerto de ratón.

Ejemplo 8: estudio de escalado de dosis de fase I de M200 en pacientes humanos con tumores sólidos refractarios

**A. Resumen general**

Se llevó a cabo un estudio de etiqueta abierta de fase I en dos partes con el fin de determinar los efectos del tratamiento con hasta 6 niveles de dosis, entre 0,5 mg/kg y 15,0 mg/kg de M200 (volociximab) en 21 pacientes humanos con una diversidad de tipos de tumor sólido refractario. La duración total del tratamiento para la primera parte fue de 6 semanas, con evaluaciones físicas hasta 45 días después de la última dosis. La segunda parte fue un estudio de extensión en el que 6 de los 11 pacientes que mostró una respuesta estable frente a la enfermedad en la primera parte recibió una dosificación continua de M200 durante como máximo 52 semanas.

**B. Parámetro y protocolos del estudio**

1. Selección de los pacientes

Los pacientes seleccionados para el estudio debían satisfacer los criterios de inclusión/exclusión siguientes:

- a. Por lo menos una lesión cuantificable en las imágenes de tomografía computerizada (TC) rutinaria o de resonancia magnética (RMI).
- b. Supervivencia estimada de  $\geq 3$  meses; estado funcional del Eastern Collaborative Oncology Group (ECOG)  $\leq 2$ .
- c. Ningún tumor o metástasis del sistema nervioso central (SNC) (documentado en el cribado a partir de imágenes de la cabeza).
- d. Ninguna operación quirúrgica mayor en las 4 semanas previas a la entrada.
- e. Ninguna operación quirúrgica menor una semana previa a la entrada; no se ha efectuado quimioterapia, inmunoterapia ni radioterapia en las 4 semanas previas a la entrada.
- f. Ningún trastorno hemorrágico activo ni sucesos tromboembólicos.
- g. Ningún otro estado clínicamente significativo o médico inestable.
- h. Los pacientes que previamente habían recibido terapia de mAb murina o quimérica debían proporcionar resultados negativos en el cribado para anticuerpos anti-M200 (es decir, anticuerpo humano antimurino con reactividad cruzada [HAMA] o anticuerpo humano anti-quimérico [HACA]).

Se alistó en el estudio un total de 22 pacientes. Los tipos tumorales de los 22 pacientes fueron: colorrectal (4 pacientes, CRC), melanoma (4 pacientes, MEL), carcinoma de células renales (3 pacientes, RCC), esofágico (2

pacientes, EC), hepatocelular (2 pacientes, HCC), pulmonar (1 paciente, NSCLC), prostático (1 paciente, PRO), tiroideo (1 paciente, THY), pancreático (2 pacientes, PC), parotídeo (1 paciente, PARO) y mamario (1 paciente, BC). Veintiuno de los 22 pacientes recibieron tratamiento, y 20 de los 21 pacientes tratados completó la totalidad de las 5 dosis más seguimiento hasta el día 45. Los 21 pacientes tratados (12 varones, 9 mujeres) presentaba una mediana de edad de 59 años (intervalo de 29 a 81) y una puntuación media del Eastern Collaborative Oncology Group (ECOG) de 1 (intervalo de 0 a 2).

## 2. Selección de niveles y programación de dosificación de M200

Se seleccionaron los niveles y programación de dosificación para garantizar que la dosis más alta (15,0 mg/kg) produciría concentraciones séricas máximas claramente inferiores a las concentraciones séricas pico medias seguras observadas en monos *Cynomolgus*, y de manera que los niveles séricos valle para dosis  $\geq 1,0$  mg/kg produjesen concentraciones séricas  $>1$   $\mu\text{g/ml}$ , la concentración que produce una inhibición de 80% de la unión de la  $\alpha 5\beta 1$  a la fibronectina en un ensayo de actividad *in vitro*.

Los niveles y programación de la dosificación utilizados en el estudio fueron los siguientes. Se administró M200 a los 21 pacientes los días 1, 15, 22, 29 y 36. Los niveles de dosificación y números de pacientes en cada nivel fueron los siguientes: 0,5 mg/kg (1 paciente), 1,0 mg/kg (2 pacientes), 2,5 mg/kg (3 pacientes), 5,0 mg/kg (3 pacientes), 10,0 mg/kg (6 pacientes) y 15 mg/kg (6 pacientes). Se administró la dosis en forma de una infusión intravenosa durante 1 hora. La primera y segunda dosis se separaron por un periodo de dos semanas para permitir el muestreo de datos farmacocinéticos de dosis únicas. Las mediciones de PK en tiempo real realizadas después de la primera dosis se utilizaron para predecir la concentración sérica pico de cada paciente tras la quinta dosis. En el caso de que la concentración sérica pico predicha tras la quinta dosis fuese  $<750$   $\mu\text{g/ml}$ , el paciente recibía las 5 dosis de M200. Las 3 dosis restantes se administraron semanalmente y seguidas de un periodo de evaluación de 45 días.

Se predijeron las concentraciones séricas humanas de M200 basándose en el esquema de dosificación anteriormente indicado y aplicando el mismo intervalo de variabilidad que se observó en los monos *Cynomolgus* (es decir, 54% a 140% de la media). A la dosis más alta en el ser humano (15,0 mg/kg), se predijo que el pico medio tras 5 dosis sería de 592  $\mu\text{g/ml}$ , con un intervalo de variabilidad en el ser humano predicho de entre 320 y 829  $\mu\text{g/ml}$ . La Tabla 3 se compiló utilizando datos de PK procedentes de los estudios de monos para predecir las concentraciones séricas pico y valle ( $C_{\text{max}}$  y  $C_{\text{min}}$ , respectivamente) para cada dosis a cada nivel de dosis en el ser humano.

**Tabla 3:** niveles séricos pico y valle estimados de M200 en el ser humano

Nivel	Dosis (mg/kg)	Valor de PK <sup>a</sup>	Número de dosis				
			1	2	3	4	5
1	0,5	$C_{\text{max}}$	11	11	12	13	13
		$C_{\text{min}}^{\text{b}}$	1,5	1,6	2	2,1	2,2
2	1,0	$C_{\text{max}}$	22	22	25	26	26
		$C_{\text{min}}$	3	3	4	5	5
3	2,5	$C_{\text{max}}$	54	57	64	67	68
		$C_{\text{min}}$	9	10	13	14	15
4	5,0	$C_{\text{max}}$	108	114	132	141	147
		$C_{\text{min}}$	20	24	33	39	43
5	10,0	$C_{\text{max}}$	216	236	282	317	346
		$C_{\text{min}}$	51	66	101	131	156
6	15,0	$C_{\text{max}}$	324	366	450	524	592
		$C_{\text{min}}$	91	126	200	268	332
		Intervalo de $C_{\text{max}}$ (54% a 140%)	175-453	197-512	243-629	283-733	320-829

<sup>a</sup>Valores expresados en  $\mu\text{g/ml}$ .

<sup>b</sup>Calculado para valores esperados 1 semana después de la primera dosis.

Basándose en la tabla anterior, la vida media terminal en el ser humano a una dosis de 15,0 mg/kg se predijo que era de aproximadamente 13 días, y menor para dosis más bajas. La acumulación de M200 en suero se predijo que sería sustancial a niveles de dosis  $\geq 5,0$  mg/kg, alcanzándose una concentración estable en 4 semanas para todas las dosis  $<10,0$  mg/kg y en 5 semanas para dosis  $\geq 10,0$  mg/kg.

## 3. Formulación y administración de M200

Se preparó la sustancia biológica M200 a granel siguiendo las buenas prácticas de fabricación (BPF) actuales. La composición de la formulación de M200 utilizada en el presente estudio era: M200 10 mg/ml, citrato 25 mM, cloruro sódico 150 mM, polisorbato (Tween<sup>®</sup>) 80 al 0,05%, con un pH de 6,5. Esta formulación era un líquido estéril,

5 incoloro, transparente a ligeramente opalescente, sin conservantes para la utilización i.v. Se rellenó cada vial de un solo uso de 20 ml para administrar 15 ml de M200 a una concentración de 10,0 mg/ml. Cada vial de un solo uso de 10 ml se rellenó para administrar 10 ml de M200 a una concentración de 10,0 mg/ml. Los viales intactos se almacenaron en una nevera a una temperatura de entre 2°C y 8°C (entre 36°F y 46°F) y se mantuvieron sin congelación ni agitación.

Tras la preparación, se administró M200 en menos de 6 horas en el caso de que se hubiese almacenado a temperatura ambiente (25°C) o en menos de 48 horas si se encontraba refrigerado (entre 2°C y 8°C). Después de este tiempo, la solución preparada se descartó.

10 Se calculó la dosis correcta de M200 que debía administrarse en el paciente mediante multiplicación del peso del paciente (kg) por el nivel de dosis apropiado (mg/kg) para el paciente. Se utilizó el peso del paciente antes de la dosificación el día de estudio 1 para calcular la dosis durante todo el estudio. Para los pacientes alistados en las cohortes de dosis de 0,5 mg/kg a 10,0 mg/kg y para los pacientes de un peso  $\leq$  80 kg incluidos en la cohorte de dosis de 15,0 mg/kg, la dosis se administró en un volumen total fijo de 120 ml durante una hora.

20 Aunque se administraron en el paciente 120 ml del fármaco de estudio diluido, se preparó la bolsa de infusión para que contuviese un total de 150 ml. Los 30 ml adicionales se utilizaron para cebar la línea de infusión y no estaban destinados a ser administrados en el paciente. De esta manera, la dosis total de fármaco de estudio contenido en la bolsa de infusión era la dosis del paciente (es decir, el peso del paciente (kg) x nivel de dosis [mg/kg] multiplicado por 1,25). Se llevó el volumen total en la bolsa de infusión hasta 150 ml mediante la adición de cloruro sódico para inyección, USP (al 0,9%).

25 En los pacientes que pesaban >80 kg alistados en la cohorte de dosis de 15,0 mg/kg, su dosis se administró en un volumen total fijo de 180 ml durante una hora. Aunque se administraron en el paciente 180 ml del fármaco de estudio diluido, se preparó la bolsa de infusión para que contuviese un total de 210 ml. Se utilizaron 30 ml adicionales para cebar la línea de infusión y no se administraron en el paciente. De esta manera, la dosis total de fármaco de estudio contenido en la bolsa de infusión era la dosis del paciente (es decir el peso del paciente (kg) x nivel de dosis [mg/kg] multiplicado por 1,167). Se llevó el volumen total en la bolsa de infusión a 210 ml mediante la adición de cloruro sódico para inyección, USP (al 0,9%).

35 La línea de infusión prerrellena se conectó directamente al acceso IV del paciente (por ejemplo un tubo heparinizado). El líquido de infusión se administró a un caudal de 2 ml/minuto (ó 3 ml/minuto para los pacientes de la cohorte de 15,0 mg/kg que pesaban >80 kg) durante una hora utilizando una bomba de infusión.

#### 4. Criterios de valoración primarios y sucesos adversos

40 Los puntos de valoración del estudio comprenden la dosis tolerada, la toxicidad limitante de dosis, el perfil de seguridad, la inmunogenicidad, la farmacocinética (PK), la saturación de monocitos (monocitos que expresan el receptor  $\alpha 5\beta 1$ ), y la respuesta tumoral basados en los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST) (ver Therasse P. *et al.*, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors", Journal of the National Cancer Institute 92(3):205-216, 2000, que se incorpora como referencia en su totalidad en la presente memoria).

45 Se clasificaron los sucesos adversos utilizando los criterios terminológicos comunes para sucesos adversos (CTCAE) del National Cancer Institute (NCI), versión 3.0. Se define la toxicidad limitante de dosis como cualquier suceso adverso de grado 3 ó 4, excluyendo las hospitalizaciones programadas o las cirugías electivas. Se excluyeron los sucesos adversos de grado 3 ó 4 considerados sin relación con M200, en su caso tras una revisión con el monitor médico y los organismos de regulación.

50 En las evaluaciones del paciente durante el estudio se llevó a cabo lo siguiente:

55 a. Cribado (en los primeros 14 días del estudio) de: historial médico y examen físico, estado funcional del ECOG, panel químico rutinario, recuento sanguíneo completo (CBC) con diferencial y plaquetas, proteína C-reactiva sensible (CRP), urinalisis con análisis microscópico (UA/micro), electrocardiograma (ECG), radiografía torácica (CXR), TC o RMI corporal orientada a enfermedad, prueba de orina del embarazo en las 48 horas previas a la dosificación y estudios de coagulación (tiempo de protrombina [PT] y tiempo parcial de tromboplastina [PTT]), anticuerpos anti-M200 (es decir, para detectar HAMA o HACA de reactividad cruzada) para pacientes que previamente han recibido anticuerpos murinos o quiméricos, TC cefálica para pacientes con tumores que habitualmente metastatizan al cerebro o al SNC y, en algunos pacientes, una biopsia para evaluar la vascularización del tumor.

60 b. Evaluaciones de laboratorio en el estudio: panel químico rutinario, urato, amilasa sérica, CBC con diferencial y plaquetas, UA/micro.

65

c. Se utilizaron las imágenes radiográficas rutinarias dirigidas a enfermedad (por ejemplo el escaneo de TC) antes y después del tratamiento con M200 para evaluar la respuesta tumoral utilizando criterios RECIST unidimensionales. Se seleccionaron las lesiones diana basándose en su tamaño (lesiones con el diámetro más largo (LD)) y su idoneidad para la realización de mediciones repetitivas exactas (mediante técnicas de obtención de imágenes o clínicamente). Se calculó una suma del LD de todas las lesiones diana, la cual se informa como suma de LD de línea base. La suma de LD de línea base se utilizó como referencia en la caracterización de la respuesta tumoral objetiva. Se utilizaron los criterios de respuesta siguientes para las lesiones diana con el fin de evaluar la respuesta global óptima.

10 • Respuesta completa (CR): desaparición de todas las lesiones diana, confirmada por imágenes repetidas 25 a 28 días después de la documentación de la primera CR.

15 • Respuesta parcial (PR): reducción de por lo menos 30% de la suma de LD de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de LD de línea base, confirmada mediante imágenes repetidas 25 a 28 días después de la documentación de la primera PR.

• Enfermedad estable (SD): ni una reducción de tamaño suficiente para considerarse PR ni un incremento suficiente para considerarse PD, tomando como referencia la suma de LD más pequeña.

20 • Enfermedad progresiva (PD): un incremento de por lo menos 20% de la suma de LD de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de LD más pequeña registrada desde el inicio del tratamiento, o la aparición de una o más lesiones nuevas.

25 d. Extracción de sangre para mediciones de PK sérica, ensayos de inmunogenicidad (anticuerpos anti-M200), factores de crecimiento vascular y medición de  $\alpha 5\beta 1$  unido y no unido a monocitos sanguíneos periféricos.

30 e. Se obtuvo una biopsia por punción de 3 mm de metástasis tumoral superficial y se congeló tras el último tratamiento con M200 de pacientes que habían consentido al procedimiento (no requerido para el alistamiento). Este espécimen de biopsia pudo utilizarse para evaluar la vascularización del tumor tras el tratamiento con M200.

### 5. Mediciones farmacocinéticas

35 Se utilizaron los primeros datos de PK humana a dosis bajas para predecir los niveles séricos en el ser humano a dosis más altas (indicadas anteriormente). El suero para medir las concentraciones de M200 se obtuvo inmediatamente antes y después de la primera dosis, y a las 4, 24, 48 y 168 horas después de completarse la primera dosis. También se extrajeron muestras de suero para medir las concentraciones de M200 inmediatamente antes, al final y 4 horas después de completarse cada infusión posterior. Se dividieron estas muestras y las alícuotas se sometieron a ensayo antes de la siguiente dosis y nuevamente al final del estudio: final de la primera dosis, 168 horas después de la primera dosis, inmediatamente antes (valle) e inmediatamente después de la dosificación (pico) para la segunda, tercera, cuarta y quinta dosis. Los niveles séricos de M200 se midieron mediante ELISA.

45 Los datos de concentración plasmática-tiempo de M200 para cada paciente se sometieron a un análisis PK. Se incluyeron los parámetros siguientes en los cálculos: niveles pico ( $C_{max}$ ) y valle ( $C_{min}$ ), vida media en etapa terminal ( $T_{1/2\beta}$ ), área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC), curva de eliminación (CL) y volumen de distribución (V). Se calcularon parámetros de resumen para todos los pacientes en cada grupo de tratamiento. También se evaluaron los cambios de los parámetros PK como función de la dosis y del tiempo.

### 6. Inmunogenicidad

50 Se determinó la inmunogenicidad de M200 mediante un ensayo de ELISA de puente de doble antígeno. Se obtuvieron muestras de suero para anticuerpos anti-M200 de pacientes antes del tratamiento, previamente a la segunda dosis y al final del estudio, 45 días después de la última dosis de M200. Además, se extrajo suero para los anticuerpos anti-M200 en el caso de que el intervalo entre las dosis fuese  $\geq 2$  semanas. Se almacenaron las muestras y se evaluaron al final del estudio. Las muestras positivas para anticuerpos contra M200 se sometieron a ensayo nuevamente para anticuerpos neutralizadores de M200. Los pacientes con exposición conocida a anticuerpos monoclonales murinos o quiméricos se cribaron para la presencia de anticuerpos anti-M200 previamente a la recepción de la primera dosis de M200.

### 7. Análisis de citometría de flujo

60 La integrina  $\alpha 5\beta 1$  también se expresa sobre monocitos en la sangre periférica. Para determinar la dosis a la que los sitios de  $\alpha 5\beta 1$  en estas células circulantes se encuentran saturados con M200, se extrajeron muestras de sangre periférica antes de la primera dosis el día de estudio 1, los días de estudio 2 y 8, inmediatamente antes de cada dosis posterior y el día de estudio 43. Se determinó mediante citometría de flujo la saturación de los sitios de  $\alpha 5\beta 1$  sobre monocitos. Los monocitos se identificaron mediante la utilización de anticuerpos contra CD14. El M200 unido a la superficie de los monocitos se detectó mediante adición de anticuerpos anti-IgG4 marcados. La  $\alpha 5\beta 1$  no

ocupada (libre) sobre las células se detectó mediante adición de IIA1 marcada. También se evaluaron los porcentajes de monocitos y linfocitos que expresaban  $\alpha 5\beta 1$ .

### C. Resultados: estudio de escalado de dosis

M200 resulta bien tolerado por los pacientes a dosis de hasta 15 mg/kg y no se observaron toxicidades limitantes de dosis de M200. El resultado de respuesta global para el estudio fue: enfermedad estable (SD) en 11 pacientes y enfermedad progresiva (PD) en 10 pacientes. La Tabla 4 muestra un desglose del resultado de respuesta según dosis y tipo de tumor del paciente.

**Tabla 4: resultados de respuesta según dosis y tipo tumoral**

0,5 mg/kg	1,0 mg/kg	2,5 mg/kg	5,0 mg/kg	10,0 mg/kg	15,0 mg/kg
CRC (PD)	HCC (SD)	CRC (PD)	HCC (SD)	CRC (SD)	EC (PD)
	PC (SD)	NSCLC (SD)	EC (PD)	CRC (SD)	RCC (SD)
		MEL Ocular (PD)	THY (PD)	PARO (SD)	PRO (PD)
				BC (SD)	MEL (PD)
				RCC (SD)	MEL (SD)
				MEL (PD)	RCC (PD)

Abreviaturas: CRC=colorrectal, MEL=melanoma, RCC=renal, EC=esofágico, HCC=hepatocelular, NSCLC=pulmón, PRO=próstata, THY=tiroides, PC=pancreático, PARO=parótida, BC=mama, SD=enfermedad estable, PD=enfermedad progresiva

Los sucesos adversos fueron generalmente de intensidad leve a moderada y entre ellos se incluían fatiga, náusea, estreñimiento, cefalea y anorexia. No se produjeron sucesos adversos severos o graves que fuesen limitantes de dosis o considerados por los investigadores como relacionados con M200. Tres pacientes a los niveles de dosis de 0,5 mg/kg y de 1,0 mg/kg resultaron positivos en el ensayo para anticuerpos anti-M200, pero aparentemente no se produjeron sucesos adversos asociados. Ningún paciente en las cohortes de dosis altas presentó un resultado positivo para anti-M200. El único paciente que recibió 0,5 mg/kg presentaba fiebre tras la primera dosis, que se registró como una reacción de infusión. Sin embargo, el paciente completó las 5 dosis de M200 sin episodios posteriores de fiebre ni otros indicios de reacción a la infusión.

Los datos del estudio indican que M200 muestra una farmacocinética no lineal. Se observó una eliminación más lenta a las concentraciones más elevadas, con la  $T_{1/2}=15,7$  días al nivel de dosis de 10 mg/kg. Además, la dosis de 10 mg/kg resultó en la saturación de los monocitos, y presentó un nivel valle medio de 82  $\mu\text{g/ml}$  dos semanas después de la primera dosis, que es superior a la concentración *in vitro* efectiva mínima de entre 2 y 3  $\mu\text{g/ml}$ .

### D. Resultados: estudio de extensión

Seis de los 11 pacientes que mostraban una respuesta de enfermedad estable o mejor iniciaron un estudio de extensión y continuaron con la dosificación. Tal como se muestra en la Tabla 5, posteriormente, 5 de los 6 pacientes mostraron una respuesta de enfermedad estable (SD) o mejor. Uno de estos pacientes con cáncer de células renales (RCC) en la cohorte de 15,0 mg/kg consiguió una respuesta parcial.

**Tabla 5: resultados del estudio de extensión**

Cohorte de dosis (nº de pacientes; tipo de tumor)	Resultado de mejor respuesta	Tiempo hasta la progresión* (días)
2,5 mg/kg (1; NSCLC)	SD	129
5 mg/kg (1; HCC)	SD	122
10 mg/kg (1; CRC)	PD	70
10 mg/kg (1; PARO)	SD	143
15 mg/kg (1; RCC)	PR	214
15 mg/kg (1; MEL)	SD	172+ (en el estudio)

\* Incluía 43 días de estudio de escalado de dosis más días de estudio de extensión. Se define SD como estabilización de  $\geq 16$  semanas (112 días).

Ejemplo 9: estudio de etiqueta abierta de fase II de M200 en pacientes humanos con carcinoma metastásico de células renales

### A. Resumen general

Basándose en la eficacia de M200 demostrada en el estudio de fase I del Ejemplo 8, se llevó a cabo un estudio en 2 etapas de un brazo, multicentro, de etiqueta abierta, de fase II de la eficacia de M200 para el tratamiento de

pacientes humanos. El objetivo principal del estudio es evaluar la eficacia (respuesta tumoral) de M200 en pacientes con carcinoma metastásico de células renales (RCC), definido utilizando criterios de respuesta para tumores sólidos (ver RECIST, Ejemplo 8, anteriormente). El estudio también presenta como objetivos secundarios, la evaluación de otras medidas de eficacia (es decir, tiempo hasta el progreso de la enfermedad y duración de la respuesta) y evaluación adicional de la seguridad, inmunogenicidad y parámetros PK de M200 que se evaluaron inicialmente en el estudio de fase I del Ejemplo 8. Un objetivo exploratorio adicional fue medir marcadores biológicos detectables en suero y plasma. El estudio incluyó hasta 40 pacientes en un máximo de ocho sitios de investigación. Se incluyeron veinte pacientes en la etapa uno del estudio. En el caso de que se confirmarse una respuesta completa (CR) o una respuesta parcial (PR) a los 4 meses (16 semanas) o en el caso de que se observase una enfermedad estable (SD) a los 4 meses, se alistaron 20 pacientes adicionales (etapa 2). Todos los pacientes recibieron M200 (10 mg/kg) en forma de infusión intravenosa durante 30 minutos una vez cada dos semanas durante un máximo de 52 semanas o hasta observar la progresión de la enfermedad, lo que ocurra primero. La última visita del estudio se produce 45 días después de la última dosis o en el momento de la terminación temprana en el caso de que el paciente no pueda volver. Se realiza una visita de seguimiento 3 meses después de la última dosis. En el caso de que no se pueda realizar una visita, el seguimiento se lleva a cabo por teléfono. El seguimiento de largo plazo se lleva a cabo telefónicamente 6 meses después de la última dosis.

**B. Parámetros y protocolos del estudio**

El estudio de fase II se lleva a cabo según los parámetros y protocolos descritos en la Tabla 6, a continuación.

**Tabla 6: parámetros del estudio de fase II en pacientes con carcinoma metastásico de células renales**

Población de estudio:	Varones y hembras de, por lo menos, 18 años de edad con RCC metastásica de histología de células claras.
Criterios clave de inclusión/exclusión de pacientes	<p><b>Inclusión:</b> varones y mujeres de, como mínimo, 18 años de edad con RCC metastásica de histología predominantemente de células claras, quienes han recibido 0 a 2 regímenes previos para enfermedad metastásica; enfermedad cuantificable según los criterios de respuesta para tumores sólidos (RECIST); estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ≤1; resultado negativo de la prueba de embarazo (únicamente mujeres fértiles); niveles de laboratorio pretratamiento que cumplen criterios específicos, y consentimiento informado firmado, incluyendo permiso para utilizar información sanitaria protegida (PHI).</p> <p><b>Exclusión:</b> cualquiera de las histologías siguientes del RCC: papilar, cromóforo, de conductos colectores o no clasificado; sensibilidad conocida a proteínas murinas o a anticuerpos quiméricos o a otros componentes del producto; utilización de cualquier fármaco en investigación dentro de las 4 semanas anteriores al cribado o 5 semividas del fármaco en investigación anterior (optando por el periodo más largo); quimioterapia sistémica, inmunoterapia, terapia de radiación, o terapia de anticuerpos monoclonales dentro de las 4 semanas anteriores a la administración de M200; tumor en el SNC o metástasis en el SNC documentados; historia de sucesos tromboembólicos y trastornos hemorrágicos en el último año, y afecciones médicas que podrían resultar exacerbadas por las hemorragias.</p>
Tamaño muestral:	Pueden incluirse hasta 40 pacientes. Veinte pacientes se incluirán en la etapa 1. En el caso de que se observe una respuesta completa (CR) o una respuesta parcial (PR) confirmadas a los 4 meses (16 semanas) o en el caso de que se observe una enfermedad estable (SD) a los 4 meses, se incluirán 20 pacientes adicionales (etapa 2).
Forma y potencia de dosificación/Formulación:	M200 es un líquido estéril, incoloro, transparente a ligeramente opalescente, sin conservantes, para la utilización I.V. Se rellena cada vial de un solo uso de 10 ml para administrar 10 ml de M200 a una concentración



	de 10 mg/ml. La composición de cada vial es de 10 mg/ml de M200, citrato 25 mM, cloruro sódico 150 mM y polisorbato (Tween®) 80 al 0,05%, con un pH de 6,5.
Almacenamiento y filtración:	Los viales intactos se almacenan en una nevera a una temperatura de entre 2°C y 8°C (entre 36°F y 46°F). No congelar ni agitar. M200 debe administrarse en 6 horas en el caso de que se almacene a temperatura ambiente (25°C) o en 48 horas en el caso de que se haya refrigerado (entre 2°C y 8°C). Después de este tiempo, debe descartarse la solución preparada.
Régimen de dosificación/vía de administración:	<p>Todos los pacientes elegibles reciben 10 mg/kg de M200 mediante infusión intravenosa (I.V.) durante 30 minutos cada dos semanas durante como máximo 52 semanas o hasta la progresión de la enfermedad, lo que ocurra primero.</p> <p>La dosis de M200 que debe administrarse en el paciente se calcula multiplicando el peso del paciente (kg) por el nivel de dosis (10 mg/kg). El peso predosis del paciente el día de estudio 0 se utiliza para calcular la dosis durante todo el estudio, con la condición de que el peso no varíe en más de 10%.</p> <p>Se extrae el volumen apropiado de la formulación de 10 mg/ml de M200 y se diluye con cloruro sódico al 0,9% hasta un volumen final de 120 ml para la infusión I.V. en el paciente durante el periodo de 30 minutos.</p>
Duración del tratamiento y seguimiento:	Todos los pacientes reciben M200 (10 mg/kg) por vía intravenosa una vez cada dos semanas durante como máximo 52 semanas o hasta la progresión de la enfermedad, lo que ocurra primero. La visita final del estudio se produce 45 días después de la última dosis o en el momento de la terminación temprana en el caso de que el paciente no pueda volver. Se realiza una visita de seguimiento 3 meses después de la última dosis. En el caso de que no se pueda realizar una visita, el seguimiento se lleva a cabo por teléfono. El seguimiento de largo plazo se lleva a cabo telefónicamente 6 meses después de la última dosis.
Criterios de valoración:	El criterio de valoración principal del presente estudio es la proporción de pacientes con una respuesta tumoral confirmada en cualquier momento durante el estudio. Los criterios de valoración secundarios son los siguientes: (1) tiempo hasta la progresión de la enfermedad, (2) duración de la respuesta tumoral, (3) PK de M200, y (4) inmunogenicidad. El criterio de valoración exploratorio es la medición de marcadores biológicos detectables en suero y plasma.
Medidas de eficacia:	<p>Imágenes radiográficas dirigidas a la enfermedad cada 8 semanas (2 meses) para evaluar la respuesta tumoral utilizando RECIST unidimensional. En el cribado, se realizan TC o RMI de la cabeza, tórax, abdomen y pelvis. Cada 8 semanas, se realiza un examen físico completo y escaneos de todas las lesiones presentes en el cribado además de todas las lesiones anatómicas dirigidas a la enfermedad. Para cualquier PR o CR, se repiten las imágenes radiográficas de confirmación un mes (entre los 28 y 35 días) después de la PR o CR.</p> <p>Todas las lesiones cuantificables hasta un máximo de 5 lesiones por órgano y 10 lesiones en total, representativas de todos los órganos implicados, deben identificarse como lesiones diana y registrarse y cuantificarse en la línea base. Se definen las lesiones cuantificables del modo siguiente: 2,0 cm en una</p>

	<p>dimensión utilizando TC/RMI convencionales y 1,0 cm en una dimensión utilizando la TC espinal. Se calcula la suma del diámetro más largo (LD) de todas las lesiones diana, informándose como la suma de LD de línea base. La suma de LD de línea base se utiliza como referencia en la caracterización de la respuesta tumoral objetiva.</p>
Mediciones de seguridad:	<p>Se realiza un seguimiento de las mediciones de seguridad siguientes: sucesos adversos (AE), sucesos adversos graves (SAE), resultados del examen físico, signos vitales y valores de laboratorio anormales.</p>
Mediciones farmacocinéticas:	<p>Se obtienen mediciones farmacocinéticas (PK) de todos los pacientes previamente a la dosificación (en los 15 minutos previos a la dosificación) y después de la dosificación (una hora después del final de la infusión): día 0, semanas 2, 4 y 6, una vez cada mes (semanas 8, 16, 24, 32, 40, 48), semana 52, visita final del estudio y seguimiento a los 3 meses (en caso posible). Las muestras obtenidas para la PK pueden utilizarse para los análisis anti-Ab, en caso necesario.</p>
Inmunogenicidad:	<p>Se realizan mediciones anti-Ab en todos los pacientes dentro de los 15 minutos anteriores a la dosificación el día 0, en la semana 8, en la visita final del estudio y en el seguimiento a los 3 meses (si fuera posible). Las muestras obtenidas para la PK pueden utilizarse para los análisis anti-Ab, en caso necesario.</p>
Otras mediciones:	<p>Un ensayo exploratorio evaluará la presencia de marcadores biológicos en suero y plasma. Los marcadores de cáncer siguientes se encuentran incluidos en el ensayo: CEA, CA 19-9, Syndecan, IGFBP-2 y LFL2. Se incluyen las citoquinas/factores de crecimiento siguientes: MIA, IL-6, TNF-alfa, PGF, VEGF, EGF y bFGF.</p>
Métodos estadísticos:	<p>Este diseño del estudio proporciona un poder de detección de por lo menos 79,5% de una tasa de respuesta global de <math>\geq 20\%</math>, mostrando como máximo 20% de los respondedores una enfermedad estable (SD). Los estadísticos de resumen y los intervalos de confianza al 95% se proporcionan para los criterios de puntuación dicotómicos. Se utilizan métodos de Kaplan-Meier para resumir las variables temporales.</p>

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica que comprende una formulación líquida que comprende:

5 1,0 a 15 mg/ml de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 5\beta 1$ ;

22 a 28 mM de citrato;

135 a 165 mM de cloruro sódico;

10 polisorbato (Tween®) 80 al 0,04 a 0,06%;

y un pH de 6,3 a 6,7;

15 en la que la cadena pesada del anticuerpo presenta la secuencia:

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTISGFSLTDYGVHWVRQ  
PPGKGLEWLVVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNSKSQ  
VFLIMNSLQTD DSAMYYCARHGTYYGMTTGDALDYWG  
QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPS  
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDV  
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN  
HYTQKSLSLSLGK

y en la que la cadena ligera del anticuerpo presenta la secuencia:

20

QIVLTQSPA IMSASLGERVTMTCTASSSVSSNYLHWYQ  
QKPGSAPNLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGT  
SYSLTIS SMEAEDAATYYCHQYLRSPPTFGG  
GKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQ  
DSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  
GLSSPVTKSFNRGEC.

2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la composición líquida comprende:

25 10 mg/ml de anticuerpo anti-integrina  $\alpha 5\beta 1$ ;

25 mM de citrato;

150 mM de cloruro sódico;

30 polisorbato (Tween®) 80 al 0,05%;

y un pH de 6,5.

35 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un agente quimioterapéutico.

4. Composición según la reivindicación 1 para la utilización en la inhibición de la proliferación de una célula cancerosa en un paciente en el que la célula cancerosa expresa la integrina  $\alpha 5\beta 1$  sobre su superficie.
- 5 5. Composición según la reivindicación 1 para la utilización en el tratamiento de un cáncer que expresa la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , en la que el sujeto no ha desarrollado todavía un tumor.
- 10 6. Composición según la reivindicación 1 para la utilización según la reivindicación 4 ó 5, en la que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, fibrosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer ovárico, carcinoma de células renales y cáncer de bazo.
7. Composición según la reivindicación 1 para la utilización según la reivindicación 4 ó 5, en la que el cáncer es el carcinoma de células renales o el melanoma metastásico.
- 15 8. Composición según la reivindicación 1 para la utilización según la reivindicación 4 ó 5, en la que el anticuerpo se encuentra a una dosis terapéuticamente efectiva de 10 mg/kg.

A. Secuencias de V<sub>H</sub> de IIA1

[NA, SEC ID nº : 1; AA, SEC ID nº : 2]

1 ATGGCTGTCCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGGTACTTTCCCAAGCTGTGTCCTGTCCCAG  
M A V L G L L L C L V T F P S C V L S Q  
61 GTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACA  
V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T  
121 TGCACCATCTCAGGGTTCATTAAACCGACTATGGTGTTCACTGGGTTCCGCCAGCCTCCA  
C T I S G F S L T D Y G V H W V R Q P P  
181 GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGAATTTGGAGTGATGGAAGCTCAACCTATAATTCA  
G K G L E W L V V I W S D G S S T Y N S  
241 GCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAATA  
A L K S R M T I R K D N S K S Q V F L I  
301 ATGAACAGTCTCCAAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGTGCCAGACATGGAACCTTAC  
M N S L Q T D D S A M Y Y C A R H G T Y  
361 TACGGTATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC  
Y G M T T T G D A L D Y W G Q G T S V T  
421 GTCTCCTCA  
V S S

B. Secuencias de V<sub>L</sub> de IIA1

[NA, SEC ID nº : 3; AA, SEC ID nº : 4]

1 ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCC  
M D F Q V Q I F S F L L I S A S V I M S  
61 AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGG  
R G Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R  
121 GTCACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAAGTGTAAAGTTCCAATTACTTGCACTGGTACCAG  
V T M T C T A S S S V S S N Y L H W Y Q  
181 CAGAAGCCAGGATCCGCCCCAATCTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGA  
Q K P G S A P N L W I Y S T S N L A S G  
241 GTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC  
V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S  
301 ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTTCCCCACCGACG  
M E A E D A A T Y Y C H Q Y L R S P P T  
361 TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA  
F G G G T K L E I K

FIGURA 1

A. Secuencias de M2200 de V<sub>H</sub>

[NA, SEC ID nº : 5; AA, SEC ID nº : 6]

```

1  TCTAGACCACCATGGCTGTCCTGGGGCTGCTTCTCTGCCTGGTGACTTTCCCAAGCTGTG
      M A V L G L L L C L V T F P S C
61  TCCTGTCCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
      V L S Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S
121 TGTCATCACATGCACCATCTCAGGGTTCTCATTAACCGACTATGGTGTTCACTGGGTTTC
      L S I T C T I S G F S L T D Y G V H W V
181 GCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATTTGGAGTGATGGAAGCTCAA
      R Q P P G K G L E W L V V I W S D G S S
241 CCTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGAATGACCATCAGGAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAG
      T Y N S A L K S R M T I R K D N S K S Q
301 TTTTCTTAATAATGAACAGTCTCCAACTGATGACTCAGCCATGTACTACTGTGCCAGAC
      V F L I M N S L Q T D D S A M Y Y C A R
361 ATGGAACCTACTACGGAAATGACTACGACGGGGGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAA
      H G T Y Y G M T T T G D A L D Y W G Q G
421 CCTCAGTCACCGTCTCCTCAG^GTAAGAATGGCCTCTAGA
      T S V T V S S
    
```

B. Secuencias de M2200 de V<sub>L</sub>

[NA, SEC ID nº : 7; AA, SEC ID nº : 8]

```

1  ACCGTCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAG
      M D F Q V Q I F S F L L I S A S
61  TCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTC
      V I M S R G Q I V L T Q S P A I M S A S
121 TAGGGGAACGGGTACCATGACCTGCACTGCCAGTTCAAGTGTCAGTTCCAATTACTTGC
      L G E R V T M T C T A S S S V S S N Y L
181 ACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCGCCCCCAATCTCTGGATTTATAGCACATCCAACC
      H W Y Q Q K P G S A P N L W I Y S T S N
241 TGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCA
      L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L
301 CAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCTTCGTT
      T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y L R
361 CCCCACCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC^GTAAGTAGAATCCAAGT
      S P P T F G G G T K L E I K
421 CTAGA
    
```

FIGURA 2