

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 866**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 27/00** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2005 E 05818382 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1812797**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento y prevención de enfermedades hiperproliferativas**

30 Prioridad:

**28.10.2004 US 623197 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.07.2013**

73 Titular/es:

**LPATH, INC. (100.0%)  
4025 Sorrento Valley Blvd.  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SABBADINI, ROGER A.;  
CAVALLI, AMY L. y  
GARLAND, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 410 866 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

Composiciones y procedimientos para el tratamiento y prevención de enfermedades hiperproliferativas

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere en general al área del tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos hiperproliferativos y, en particular, cáncer y otras patologías caracterizadas por una neovascularización excesiva. Estos resultados útiles se consiguen mediante el uso de agentes y composiciones que contienen tales agentes que interfieren con la producción y/o actividades biológicas de los esfingolípidos y sus metabolitos.

**Antecedentes de la invención**1. Introducción

10 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para comprender la presente invención. No es un reconocimiento de que tal información sea técnica anterior, o pertinente, para las invenciones reivindicadas en la presente memoria, o que cualquier publicación específica o implícitamente referenciada sea técnica anterior.

2. Antecedentes

15 Existen muchos trastornos hiperproliferativos conocidos, en los que las células de diversos tejidos y órganos exhiben patrones aberrantes de crecimiento, proliferación, migración, señalización, senescencia y muerte. Aunque se han desarrollado varios tratamientos para hacer frente a algunas de estas enfermedades, muchas todavía permanecen en gran parte intratables con las tecnologías existentes, mientras que en otros casos, aunque existen tratamientos, estos son frecuentemente menos óptimos y raramente curativos.

20 El cáncer representa tal vez la clase más ampliamente reconocida de trastornos hiperproliferativos. Los cánceres son una clase de enfermedades devastadoras, y en conjunto, tienen una tasa de mortalidad por detrás solamente de la enfermedad cardiovascular. Muchos cánceres no se entienden completamente a nivel molecular. Por consiguiente, el cáncer es una prioridad de los programas de investigación y desarrollo, tanto para el gobierno de los Estados Unidos como para las compañías farmacéuticas. El resultado ha sido un esfuerzo en I+D sin precedentes y la producción de muchos agentes terapéuticos valiosos para ayudar en la lucha contra el cáncer.

25 Por desgracia, la enorme cantidad de investigación sobre el cáncer no ha sido suficiente para superar los importantes daños causados por el cáncer. Todavía hay más de un millón de nuevos casos de cáncer diagnosticados cada año y solamente en los Estados Unidos producen más de quinientas mil muertes. Esto es una demostración dramática de que a pesar del gran esfuerzo que se ha hecho para descubrir nuevas terapias para el cáncer, los agentes terapéuticos eficaces para combatir la enfermedad, siguen siendo esquivos.

30 El cáncer se trata ahora principalmente con una o una combinación de tres tipos de terapias, cirugía, radiación y quimioterapia. La cirugía implica la eliminación de la masa tumoral. Aunque la cirugía a veces es eficaz en la eliminación de tumores localizados en ciertos sitios, por ejemplo, en la mama, colon y piel, no se puede utilizar en el tratamiento de tumores localizados en otras áreas, tales como la columna vertebral, ni en el tratamiento de trastornos neoplásicos diseminados, tales como la leucemia. La radioterapia implica la exposición de tejido vivo a la radiación ionizante que causa la muerte o daño a las células expuestas. Los efectos secundarios de la radioterapia pueden ser agudos y temporales, mientras que otros pueden ser irreversibles. La quimioterapia implica la alteración de la replicación celular o del metabolismo celular.

40 Otra agresión adicional es que los agentes terapéuticos actuales, por lo general, van asociados a inconvenientes significativos para el paciente en la forma de toxicidad y efectos secundarios graves. Por lo tanto, muchos grupos han comenzado recientemente a buscar nuevos enfoques para ganar la batalla contra el cáncer. Estas nuevas llamadas "terapias innovadoras" incluyen la terapia génica y proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos monoclonales.

45 El monoclonal utilizado por primera vez en la clínica para el tratamiento de cáncer fue Rituxan (rituximab), que fue lanzado en 1997 y que ha demostrado la utilidad de los anticuerpos monoclonales bioespecíficos como agentes terapéuticos. Por lo tanto, no es sorprendente que, desde entonces se hayan aprobado otros dieciséis anticuerpos monoclonales para su uso en la práctica clínica, incluyendo seis que se han prescrito para el cáncer. El éxito de estos productos, así como la reducción de costes y tiempo para desarrollar anticuerpos monoclonales en comparación con las moléculas pequeñas ha hecho de los anticuerpos monoclonales terapéuticos la segunda categoría más importante de fármacos candidatos después de las moléculas pequeñas. Además, la exquisita especificidad de los anticuerpos en comparación con los fármacos de tipo molécula pequeña ha probado ser una gran ventaja tanto en términos de eficacia como de toxicidad. Sólo para el cáncer existen en la actualidad más de 50 proyectos de I+D en la industria para el desarrollo de anticuerpos, participando más de 50 empresas en el desarrollo de nuevas fármacos anticuerpos contra el cáncer. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales están a punto de convertirse en una de las principales bazas en el tratamiento del cáncer y se estima que copará una parte  
55 cada vez mayor del mercado de fármacos contra el cáncer.

La identificación de los mediadores extracelulares que promueven el crecimiento tumoral y la supervivencia es un paso crítico en el descubrimiento de las intervenciones terapéuticas que reducirán la morbilidad y la mortalidad del cáncer. Como se describe a continuación, la esfingosina-1-fosfato (S1P), un componente clave de la cascada de señalización de los esfingolípidos, se considera que es un factor pleiotrópico del crecimiento tumorigénico. S1P promueve el crecimiento tumoral mediante la estimulación de la proliferación celular, la supervivencia celular y la metástasis. S1P también promueve la angiogénesis tumoral al favorecer la migración y supervivencia de células endoteliales que forman nuevos vasos en los tumores. En conjunto, S1P inicia una secuencia proliferativa, pro-angiogénica y anti-apoptótica de acontecimientos que contribuyen a la progresión del cáncer. Por lo tanto, las terapias que modulan, y, en particular, reducen los niveles de S1P *in vivo* serán eficaces en el tratamiento del cáncer.

Ogretmen et al. (Nature Reviews 2004, 4(8):604-16) se refiere al papel de los esfingolípidos en el desarrollo y la progresión del cáncer. Basándose en el hallazgo de que la esfingosina-1-fosfato (S1P) es tumorigénica, los autores plantean la hipótesis de que el antagonismo de S1P puede tener uso en la terapia del cáncer.

El documento WO 02051439 divulga el uso de anticuerpos para reducir las concentraciones circulantes de S1P para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

### 3. Definiciones

Antes de describir la presente invención en detalle, se definirán varias expresiones utilizadas en el contexto de la presente invención. Además de estas expresiones, se definen otras a lo largo de la descripción según sea necesario. A menos que esté expresamente definido en la presente memoria, las expresiones de la técnica utilizadas en esta descripción tendrán sus significados reconocidos en la técnica.

Una "molécula anti-S1P" se refiere a cualquier molécula que interfiere con la actividad de S1P, en particular una actividad SIP en las células que están proliferando o que son capaces de proliferar. Ejemplos representativos de tales moléculas incluyen anticuerpos anti-S1P, fragmentos de anticuerpos anti-S1P capaces de interactuar específicamente con S1P y agentes que comprenden un primer resto de unión y un segundo resto de unión, en el que uno de los restos de unión es específicamente reactivo con SIP.

La expresión "agente quimioterapéutico" significa agentes anticancerosos y otros agentes anti-hiperproliferativos. En resumen, un "agente quimioterapéutico" se refiere a una sustancia química destinada a destruir las células y tejidos. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a: (1) agentes que dañan el ADN y agentes que inhiben la síntesis de ADN: antraciclinas (doxorubicina, donorrubicina, epirubicina), agentes alquilantes (ciclofosfamida, mitomicina C, mostazas químicas), derivados del platino (cisplatino, carboplatino, cis-diaminodicloroplatino), inhibidores de la telomerasa y de la topoisomerasa (Camptosar), (2) agentes despolimerizantes de la tubulina: taxoides (paclitaxel, docetaxel, BAY 59-8862), (3) antimetabolitos: pirimidinas fluoradas (5-FU, capecitabina, 5-DFUR, gemcitabina), inhibidores de proteosoma (Velcade), metotrexatos, (4) antiangiogénicos (Avastin, talidomida), agentes disruptores vasculares (flavonoides/flavonas, DMXAA), derivados de combretastatina (CA4DP, ZD6126, AVE8062A), (5) biológicos, tales como anticuerpos (Herceptin, Avastin, Panorex, Rituxin, Zevalin, Mylotarg, Campath, Bexxar, Erbitux) y (6) terapia endocrina: inhibidores de la aromatasa (4-hidroandrostendiona, exemestano, aminoglutetimida, anastrozol, letozol), anti-estrógenos (tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, Faslodex), esteroides, tales como dexametasona, (7) inmunomoduladores: citoquinas, tales como IFN-beta e IL-2), inhibidores de integrinas, otras proteínas de adhesión y metaloproteinasas de matriz), (8) inhibidores de la histona desacetilasa, (9) inhibidores de la transducción de señales, tales como inhibidores de las tirosina quinasa como Gleevec, (10) inhibidores de proteínas de choque térmico, (11) retinoides, tales como ácido retinoico todo trans e (12) inhibidores de receptores de factores de crecimiento o de los propios factores de crecimiento.

Una clase de agentes quimioterapéuticos son los agentes alquilantes. Un "agente alquilante" se refiere a un compuesto quimioterapéutico que modifica químicamente el ADN y altera su función. Algunos agentes alquilantes alquilan el ADN, otros provocan la formación de enlaces cruzados entre los nucleótidos en la misma cadena, o en la cadena complementaria, de una molécula de ADN de doble cadena, mientras que otros provocan errores de apareamiento entre bases entre las hebras de ADN. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen bendamustina, busulfán, carboplatino, carmustina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, dacarbazina, hexametilmelamina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, mitotano, mitomicina, pipobromán, procarbazona, estreptozocina, tiotepa y trietilenmelamina. Otra clase de agentes quimioterapéuticos es la de los anti-metabolitos. Un "anti-metabolito" se refiere a un agente quimioterapéutico que interfiere con la síntesis de biomoléculas, incluidas las requeridas para la síntesis de ADN (por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos), necesarios para sintetizar el ADN. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen capecitabina, clorodesoxiadenosina, citarabina (y su forma activada, ara-CMP), arabinósido de citosina, dacabazona, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, 6-mercaptopurina, metotrexato, pentostatina, trimetrexato y 6-tioguanina. Un agente quimioterapéutico "anti-mitótico" se refiere a un agente quimioterapéutico que interfiere con la mitosis, generalmente alterando la formación de microtúbulos. Ejemplos de compuestos anti-mitóticos incluyen navelbina, paclitaxel, vinblastina taxotere, vincristina, vindesina y vinorelbina. Un "agente intercalante" se refiere a un agente quimioterapéutico que se inserta entre pares de bases adyacentes de una molécula de ADN de doble cadena, lo que altera la estructura del ADN e interfiere con la replicación del ADN, la transcripción de genes y/o la unión de proteínas de unión a ADN al ADN.

La expresión "terapia de combinación" se refiere a un régimen terapéutico que implica la administración de al menos dos terapias distintas para lograr un efecto terapéutico indicado. Por ejemplo, una terapia de combinación puede implicar la administración de dos o más principios activos químicamente diferentes, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de acción rápida y un anticuerpo anti-S1P. Como alternativa, una terapia de combinación puede implicar la administración de una molécula anti-S1P (por ejemplo, un anticuerpo anti-S1P) y/o uno o más agentes quimioterapéuticos, solos o junto con la administración de radioterapia y/o cirugía. En el contexto de la administración de dos o más principios activos químicamente distintos, se entiende que los principios activos se pueden administrar como parte de la misma composición o como composiciones diferentes. Cuando se administran como composiciones separadas, las composiciones que comprenden los diferentes ingredientes activos se pueden administrar al mismo tiempo o en diferentes tiempos, por las mismas o diferentes rutas, utilizando la misma o diferente pauta posológica, dependiendo del contexto particular requerido y según lo determine el médico. Del mismo modo, cuando una o más especies de molécula anti-S1P, solas o junto con agentes quimioterapéuticos se combinan con, por ejemplo, radiación y/o cirugía, el fármaco(s) se puede administrar antes o después de la cirugía o de la radioterapia.

El término "trastorno hiperproliferativo" se refiere a las enfermedades y trastornos asociados con, las células en proliferación sin control, incluyendo pero sin limitación, a un crecimiento incontrolado de las células de órganos y tejidos resultantes en cánceres y tumores benignos. Los trastornos hiperproliferativos asociados a células endoteliales pueden dar lugar a enfermedades debidas a angiogénesis, tales como angiomas, endometriosis, obesidad, degeneración macular asociada con la edad y diversos retinopatías, así como la proliferación de las células endoteliales y células del músculo liso que causan reestenosis como consecuencia de la colocación de stents en el tratamiento de la aterosclerosis. Trastornos hiperproliferativos que implican fibroblastos (es decir, la fibrogénesis) incluyen, pero no se limitan a, trastornos de cicatrización excesiva (es decir, la fibrosis), tales como degeneración macular asociada con la edad, remodelación cardíaca e insuficiencia asociada a infarto de miocardio, cicatrización de heridas excesiva, como ocurre comúnmente como consecuencia de una lesión o cirugía, queloides y tumores fibroides y la colocación de stents.

En el contexto de la presente invención, una "composición líquida" se refiere a una que, en su forma llenada y acabada tal como es proporcionada por un fabricante a un usuario final (por ejemplo, un médico o una enfermera), es un líquido o solución, en oposición a un sólido. En la presente memoria, "sólido" se refiere a composiciones que no son líquidas ni soluciones. Por ejemplo, sólidos incluyen composiciones secas preparadas por liofilización, secado por congelación, precipitación y procedimientos similares.

"Monoterapia" se refiere a un régimen de tratamiento basado en la administración de un compuesto terapéuticamente eficaz, tanto si se administra como una dosis única como en varias dosis a lo largo del tiempo.

"Neoplasia" se refiere al crecimiento celular anormal y descontrolado. Un "neoplasma", o tumor, es una proliferación anormal, no regulada y desorganizada del crecimiento celular y se conoce generalmente como cáncer. Un neoplasma puede ser benigno o maligno. Un neoplasma es maligno o canceroso si tiene propiedades de crecimiento destructivo, invasividad y metástasis. Invasividad se refiere a la diseminación local de un neoplasma por infiltración o destrucción del tejido circundante, por lo general destruyendo las láminas basales que definen los límites de los tejidos, penetrando de esta manera generalmente en el sistema circulatorio del cuerpo. La metástasis se refiere normalmente a la diseminación de las células tumorales por los vasos linfáticos o los vasos sanguíneos. La metástasis también se refiere a la migración de las células tumorales por expansión directa a través de las cavidades serosas o subaracnoidea u otros espacios. Mediante el proceso de la metástasis, la migración de células tumorales a otras áreas del cuerpo establece neoplasmas en áreas alejadas del sitio de la aparición inicial.

Por una composición, procedimiento, equipo o artículo de fabricación "patentable", según la invención, se entiende que el objeto satisface todos los requisitos legales de patentabilidad en el momento que se realiza el análisis. Por ejemplo, en cuanto a la novedad, no obviedad, o similar, si la investigación revela más adelante que una o más reivindicaciones abarcan una o más realizaciones que niegan la novedad, no obviedad, etc. la reivindicación(es) que se va a limitar por definición a las realizaciones "patentables", específicamente excluye la realización(es) no patentable(s). Además, las reivindicaciones adjuntas se han de interpretar en el sentido de proporcionar el alcance razonable más amplio, así como para preservar su validez. Por otra parte, si uno o más de los requisitos legales de patentabilidad son modificados o si se cumple un determinado requisito legal para la patentabilidad desde el momento de presentar esta solicitud o se concede como patente hasta el momento en que se cuestione la validez de una o más de las reivindicaciones adjuntas, las reivindicaciones se han de interpretar de manera que (1) conserven su validez y (2) proporcionen la interpretación más amplia razonable en las circunstancias.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los agentes y compuestos de la presente invención y que no son biológicamente o de otra manera no deseables. En muchos casos, los agentes y los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o base en virtud de la presencia de grupos cargados, por ejemplo, grupos amino y/o carboxilo cargados o grupos similares a estos. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos, mientras que las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables, véase Berge, et al. ((1977) J. Pharm. Sci., Vol. 66, 1).

Una "pluralidad" significa más de uno.

Los términos "separado", "purificado", "aislado" y similares, significan que uno o más componentes de una muestra contenida en un recipiente de contención de la muestra son o han sido físicamente separados o diluidos en presencia de, uno o más otros componentes de la muestra presentes en el recipiente. Componentes de la muestra que se pueden separar o diluir durante una etapa de separación o purificación incluyen, productos de reacción química, productos químicos que no han reaccionado, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, y moléculas no unidas.

El término "especie" se utiliza en la presente memoria en diferentes contextos, por ejemplo, una especie particular de agente quimioterapéutico. En cada contexto, el término se refiere a una población de moléculas químicamente indistintas del tipo de la mencionada en el contexto particular.

"Específicamente asociado", "asociación específica" y similares se refieren a una interacción específica, no aleatoria entre dos moléculas, cuya interacción depende de la presencia de características estructurales, hidrófobas/hidrófilas, y/o electrostáticas que permiten las interacciones químicas o moleculares apropiadas entre las moléculas.

En la presente memoria, "estable" se refiere a una interacción entre dos moléculas (por ejemplo, un péptido y una molécula de TLR) que es lo suficientemente estable para que las moléculas se puedan mantener para el propósito o la manipulación deseada. Por ejemplo, una interacción "estable" entre un péptido y una molécula de TLR se refiere a aquella en la que el péptido se convierte y permanece asociado con una molécula de TLR durante un período suficiente para lograr el efecto deseado.

Un "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal en necesidad de tratamiento que puede ser efectuado por las moléculas de la invención. Los animales que pueden ser tratados de acuerdo con la invención incluyen vertebrados, siendo ejemplos particularmente preferidos los mamíferos, tales como bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos, porcinos y primates (incluyendo los seres humanos y los primates no humanos).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o "cantidad efectiva") se refiere a una cantidad de un principio activo, por ejemplo, un agente de acuerdo con la invención, suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. En consecuencia, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición según la invención puede ser determinada fácilmente por un experto normal en la técnica. En el contexto de la terapia del cáncer, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que produce un cambio medido objetivamente en uno o más parámetros asociados con la supervivencia o metabolismo de las células cancerosas, incluyendo un aumento o disminución de la expresión de uno o más genes correlacionados con el cáncer en particular, la reducción de la carga tumoral, la lisis de las células cancerosas, la detección de uno o más marcadores de muerte de las células cancerosas en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia y una parte alícuota de un fluido corporal, tal como sangre entera, plasma, suero, orina, etc.), la inducción de la apoptosis u otras vías de muerte celular, etc. Por supuesto, la cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y el trastorno en particular que se trata, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la patología, el compuesto particular elegido, la pauta posológica a seguir, el momento de la administración, la forma de administración y similares, todos los cuales los puede determinar fácilmente un experto normal en la materia. Se apreciará que en el contexto de la terapia de combinación, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de un principio activo en particular puede diferir de lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo cuando se administra como monoterapia (es decir, un régimen terapéutico que emplea solamente una entidad química como el principio activo).

El término "tratamiento" o "tratar" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno, incluyendo la prevención o la protección contra la enfermedad o trastorno (es decir, haciendo que no se desarrollen los síntomas clínicos); inhibición de la enfermedad o trastorno (es decir, deteniendo o inhibiendo el desarrollo de los síntomas clínicos y/o aliviando la enfermedad o trastorno (es decir, causando la regresión de los síntomas clínicos). Como se apreciará, no siempre es posible distinguir entre "prevenir" e "inhibir" una enfermedad o trastorno, ya que en último término, el acontecimiento o acontecimientos inductivos podrían ser desconocidos o latentes. En consecuencia, el término "profilaxis" se entenderá que constituye un tipo de "tratamiento" que abarca tanto "prevenir" como "inhibir". El término "protección" incluye, por lo tanto, "profilaxis".

La expresión "régimen terapéutico" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante el uso de agentes quimioterapéuticos y citotóxicos, radioterapia, cirugía, terapia génica, vacunas y terapia de ADN, terapia de siRNA, terapia anti-angiogénica, inmunoterapia, trasplantes de médula ósea, aptámeros y otros biológicos, tales como anticuerpos y variantes de anticuerpos, señuelos de receptores y otras terapias basadas en proteínas.

De acuerdo con el Manual Merck (14ª edición, p. 1206) cáncer es "una malignidad celular cuyas características únicas - pérdida de controles normales - tienen como resultado un crecimiento no regulado, una falta de diferenciación y la capacidad de invadir tejidos locales y metastatizar". Del mismo modo, el Instituto Nacional del Cáncer del NIH (ver <http://cancer.gov/>) define el cáncer como "un término empleado para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control. Las células cancerosas pueden invadir tejidos cercanos y pueden diseminarse a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo". Las células cancerosas

también evitan la muerte natural de las células y estimulan la formación de su propio suministro de sangre a través de un proceso conocido como angiogénesis. El NCI define la angiogénesis como "formación de vasos sanguíneos". La angiogénesis tumoral es el crecimiento de los vasos sanguíneos desde el tejido circundante hasta un tumor sólido. Esto es causado por la liberación de sustancias químicas por el tumor". La inflamación se define por el NIH como "una respuesta de enrojecimiento, hinchazón, dolor y una sensación de calor en ciertas áreas que se supone debe proteger a los tejidos afectados por una lesión o enfermedad".

### **Sumario de la invención**

Un aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a, e inhibe S1P para su uso en procedimientos para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas. Estos procedimientos comprenden administrar a un mamífero (por ejemplo, un animal bovino, canino, equino, ovino, porcino o, particularmente un humano) que se sabe o se sospecha que sufre un trastorno hiperproliferativo asociado a S1P una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un agente que inhibe la actividad de S1P, preferiblemente en un vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable, como pueda requerir la aplicación prevista. Trastornos hiperproliferativos asociados a S1P incluyen neoplasias, trastorno asociado con la proliferación de células endoteliales y trastornos asociados con la fibrogénesis. Muy a menudo, la neoplasia será un cáncer. Trastornos típicos asociados con la proliferación de las células endoteliales son los trastornos dependientes de la angiogénesis, por ejemplo, los cánceres causados por tumores sólidos, tumores hematológicos y degeneración macular asociada con la edad. Los trastornos asociados con la fibrogénesis incluyen aquellos que implican remodelación cardíaca aberrante, tales como una insuficiencia cardíaca.

El agente que interfiere con la actividad de S1P es un anticuerpo monoclonal específicamente reactivo con S1P.

En una realización preferida, la composición que comprende un agente que inhibe la actividad de S1P se administra como monoterapia, mientras que en otras realizaciones preferidas, la composición que comprende el agente que inhibe la actividad de S1P se administra como parte de una terapia de combinación. Terapias de combinación preferidas incluyen, además de la administración de la composición que comprende un agente que inhibe la actividad de S1P, la administración de un segundo régimen terapéutico seleccionado del grupo que consiste en la administración de un agente quimioterapéutico, radioterapia, cirugía y una combinación de cualquiera de los anteriores.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

Como apreciarán los expertos en la materia, la siguiente descripción detallada describe ciertas realizaciones preferidas de la invención en detalle y, por lo tanto, es sólo representativa y no describe el ámbito real de la invención. Antes de describir la presente invención en detalle, se entiende que la invención no se limita a los aspectos particulares y realizaciones descritas, ya que estos pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria es para el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el ámbito de la invención definido por las reivindicaciones adjuntas.

### **Descripción detallada**

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que se pueden utilizar moléculas anti-S1P, en particular anticuerpos anti-S1P, para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas asociadas con la actividad de S1P. Además, también se describe una clase de moléculas anti-S1P, concretamente, agentes que comprenden un primer resto de unión y un segundo resto de unión, uno de los cuales restos se une a S1P.

#### 1. Introducción

##### A. Esfingolípidos

Los esfingolípidos son componentes estructurales principales de las membranas celulares que también sirven como moléculas de señalización celular y moléculas reguladoras. La cascada de señalización de esfingolípidos incluye los mediadores lipídicos bioactivos, ceramida (CER), esfingosina (SPH) y esfingosina-1-fosfato (S1P). Estos mediadores se derivan de la esfingomielina, que está presente en las membranas plasmáticas de todas las células de mamíferos.

La forma neutra de la esfingomielinasa (nSMasa) es un componente inicial clave de la vía de señalización de los esfingolípidos. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es un activador bien conocido de la nSMasa, la producción de CER y la apoptosis en muchos tipos de células, incluidas las líneas celulares cancerosas y la activación de la nSMasa ha mostrado ser crucial para la apoptosis inducida por TNF $\alpha$ , por lo que es un objetivo para el descubrimiento de fármacos.

La molécula de señalización de esfingolípidos, S1P, se produce a partir de SPH mediante la acción de la esfingosina quinasa (SPHK). Se han identificado dos isoformas de la quinasa, SPHK1 y SPHK2. Mientras que CER y SPH se asocian comúnmente con la apoptosis, S1P se considera generalmente como un mediador extracelular de la

proliferación celular y la activación de las vías de supervivencia. S1P puede actuar como un ligando para un conjunto de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) que pertenecen a la familia de receptores S1P/LPA, anteriormente conocida como receptores Edg, sin embargo, también se han sugerido acciones intracelulares de S1P. Además, se ha sugerido que el equilibrio entre los niveles de CER/SPH frente a S1P proporciona un mecanismo de reostato que decide si una célula se envía a la vía de la muerte o se protege de la apoptosis por S1P.

La enzima reguladora clave del mecanismo de reostato es SPHK, cuya función es convertir los esfingolípidos que promueven la muerte (CER/SPH) en la S1P promotora del crecimiento. Se ha mostrado que los fibroblastos NIH-3T3 transfectados de forma estable con SPHK presentan una mayor proliferación acompañada por el aumento de la producción de S1P y los sobreexpresadores de SPHK pueden escapar a la inhibición por contacto, una propiedad comúnmente exhibida por las células transformadas. Por lo tanto, S1P puede aumentar el potencial metastásico de las líneas celulares de cáncer humano seleccionadas. Por otra parte, los transfectantes SPHK pueden producir tumores cuando se inyectan por vía subcutánea en ratones NOD/SCID. Significativamente, SPHK está sobreexpresada en muchos tumores sólidos, tales como los de mama, colon, pulmón, ovario, estómago, útero, riñón, y recto. Se ha mostrado que la apoptosis puede ser inducida en varias líneas celulares derivadas de tumores humanos mediante el tratamiento con un inhibidor de tipo molécula pequeña de SPHK, que también reduce los niveles de S1P. Además, los genotóxicos y otros anti-neoplásicos regulan a la baja SPHK como parte de sus mecanismos de acción. Del mismo modo, la regulación a la baja de SPHK por siRNA puede disminuir la resistencia de las células de melanoma a la apoptosis, mientras que el efecto protector del aumento de la expresión de Bcl-2 se ha atribuido al aumento de la expresión de SPHK. Además, el efecto anti-neoplásico de FTY70 se ha atribuido a su regulación a la baja de los receptores de S1P, lo que sugiere que la interferencia con la acción de S1P a nivel del receptor también podría ser valiosa en la terapia antitumoral, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo que interfiere con la unión al receptor de S1P. En conjunto, estos hallazgos demuestran que S1P es un factor de crecimiento probablemente producido por las mismas células tumorales y que la reducción de la concentración de S1P puede causar la apoptosis observada después de la retirada del factor de crecimiento.

#### B. S1P como una diana válida en el tratamiento del cáncer

Una estrategia de terapia del cáncer es la reducción de los niveles extracelulares biológicamente disponibles del promotor tumoral, S1P, ya sea sola o en combinación con tratamientos contra el cáncer tradicionales, incluyendo la administración de agentes quimioterapéuticos, tales como una antraciclina. Con este fin, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal (Acm) que es específico para S1P, que puede adsorber selectivamente S1P del suero, que actúa como una esponja molecular para neutralizar S1P extracelular. Dado que S1P ha mostrado ser pro-angiogénico, se puede obtener un beneficio adicional a la eficacia del anticuerpo en el sentido de la capacidad del anticuerpo de agotar el suministro de sangre al tumor en crecimiento. Así, otra estrategia antineoplásica basada en esfingolípidos implica la combinación de activadores conocidos de la producción de CER y SPH (doxorubicina, radioterapia), junto con una estrategia para reducir los niveles de S1P.

Aunque se han propuesto estrategias anticancerosas basadas en esfingolípidos dirigidas a enzimas clave de la ruta metabólica de los esfingolípidos, tales como SPHK, el propio S1P no se ha revelado como significativo, en gran parte debido a las dificultades de atacar a este y a otras dianas relacionadas. Como se describe en la presente memoria, se ha producido un anticuerpo monoclonal altamente específico para S1P que reconoce S1P en el intervalo fisiológico y que es capaz de neutralizar S1P por combinación molecular. El uso de este anticuerpo (y sus derivados) privará a las células tumorales en crecimiento de un importante factor de supervivencia. Además, el uso de este tipo de terapia contra el cáncer basada en anticuerpos también podría ser eficaz cuando se utiliza en combinación con tratamientos convencionales del cáncer, como la cirugía, la radioterapia y/o la administración de agentes contra el cáncer citotóxicos. Una terapia de combinación basada en anticuerpos puede mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos al sensibilizar a las células a la apoptosis y reducir al mínimo sus efectos secundarios tóxicos, aunque la administración del anticuerpo solo también puede tener eficacia en retrasar la progresión de la enfermedad. En efecto, la capacidad del Acm anti-S1P de retrasar la progresión del tumor en modelos de ratón de cáncer humano y en modelos de aloinjerto en ratón demuestra la utilidad de las estrategias de los anticuerpos anti-S1P en el tratamiento de tumores humanos y animales. Además, el descubrimiento de que varios tipos de cánceres humanos (por ejemplo, de ovario, de mama, de pulmón y melanoma) pueden ser tratados en modelos de xenoinjerto demuestra que las estrategias de los anticuerpos anti-S1P no se limitan a un tipo de célula o tejido cancerosos.

#### C. Esfingolípidos y angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. La angiogénesis asociada a tumores sólidos y circulantes se considera ahora como un componente crucial de la tumorigénesis, ya que la idea de que el crecimiento del tumor depende de la neovascularización está científicamente bien aceptada.

S1P estimula la síntesis de ADN y la motilidad quimiotáctica de las células endoteliales venosas humanas (HUVEC), induciendo la diferenciación de estructuras multicelulares esenciales para la formación inicial de vasos sanguíneos. S1P también promueve la migración de los precursores de células endoteliales derivados de médula ósea a los sitios de neovascularización y las células que sobre-expresan receptores S1P son resistentes a los agentes anti-angiogénicos, talidomida y Neovastat. Así, S1P, y particularmente los receptores S1 son necesarios para la angiogénesis y neovascularización. Por último, se produce una comunicación entre S1P y otros factores de crecimiento pro-angiogénicos como VEGF, EGF, PDGF, bFGF e IL-8. Por ejemplo, S1P transactiva receptores de EGF y VEGF2 y VEGF regula al alza la expresión del receptor de S1P (Igarashi, Erwin et al. 2003).

Como se apreciará, el control clínico de la angiogénesis es un componente crítico para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis, tales como la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y la endometriosis. Los agentes anti-angiogénicos también son particularmente atractivos debido a que las células endoteliales vasculares que están implicadas en la angiogénesis tumoral no mutan tan fácilmente como lo hacen las células cancerosas y, en consecuencia, las células endoteliales vasculares son menos propensas que las células cancerosas a adquirir resistencia frente a la terapia prolongada, lo que les convierte en dianas terapéuticas útiles.

Hay varias líneas de evidencia que sugieren que S1P es un factor de crecimiento pro-angiogénico potencialmente significativo que puede ser importante en la angiogénesis tumoral, incluyendo que: los anticuerpos anti-S1P pueden neutralizar la formación de túbulos inducida por S1P, la migración de las células endoteliales vasculares y la protección de la muerte celular en diversos ensayos *in vitro* utilizando HUVEC; la inyección de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama que expresan niveles elevados de S1P en las almohadillas de grasa mamaria de ratones desnudos tiene como resultado un aumento de los tumores dependientes de angiogénesis que son más grandes y más numerosos que cuando se utilizan células de control; los anticuerpos anti-S1P pueden reducir drásticamente la angiogénesis asociada a tumores en un modelo de aloinjerto de melanoma murino ortotópico; S1P aumenta el crecimiento de nuevos capilares en tapones de Matrigel implantados en ratones, un efecto que puede ser neutralizado por la administración sistémica de anticuerpos anti-S1P; la administración *in vivo* de anticuerpos anti-S1P puede neutralizar completamente la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento pro-angiogénico (por ejemplo, por bFGF y VEGF) en los ensayos murinos con tapón de Matrigel; S1P estimula la liberación de bFGF y VEGF de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*, un efecto que puede ser revertido por los anticuerpos anti-S1P; S1P aumenta la motilidad y la invasión *in vitro* de un gran número de diferentes tipos de células cancerosas, incluyendo células de glioblastoma multiforme; los anticuerpos anti-S1P reducen significativamente la neovascularización asociada con modelos animales de DMAE.

La importancia de S1P en los tumores dependientes de angiogénesis hace de S1P una excelente diana para el tratamiento del cáncer. En efecto, la neutralización con anticuerpos anti-S1P extracelular puede tener como resultado una marcada disminución en la progresión del cáncer en mamíferos, incluyendo los seres humanos, como resultado de la inhibición de la formación de vasos sanguíneos con pérdida concomitante de los nutrientes y del oxígeno necesarios para apoyar el crecimiento del tumor. Por lo tanto, los anticuerpos anti-S1P tienen varios mecanismos de acción, incluyendo: (1) efectos directos sobre la multiplicación de las células tumorales, (2) efectos anti-angiogénicos indirectos sobre las células endoteliales vasculares y (3) efectos anti-angiogénicos indirectos que impiden la liberación y acción de otros factores de crecimiento pro-angiogénicos. En consecuencia, los anticuerpos anti-S1P también pueden servir como agentes terapéuticos anti-metastáticos, además de cómo agentes terapéuticos anti-angiogénicos. Estos también serán útiles en el tratamiento de otros trastornos hiperproliferativos asociados con la actividad de S1P, como los causados por la proliferación aberrante de células endoteliales, como ocurre con la angiogénesis asociada a la DMAE.

#### D. S1P, fibrogénesis y cicatrización

##### i. S1P, fibroblastos y el proceso de remodelación

Se sabe que los fibroblastos cardíacos, especialmente los miofibroblastos, son elementos celulares clave en la formación de cicatrices en respuesta a la muerte celular y la inflamación de un infarto de miocardio (IM). La expresión de los genes del colágeno de miofibroblastos es una característica distintiva de la remodelación y necesario para la formación de cicatrices. Además de otras de sus actividades, S1P es también un mediador inflamatorio que contribuye de forma muy importante a la cicatrización de heridas mediante la activación de la migración y proliferación de los fibroblastos, además de activar las plaquetas, estimular la angiogénesis y promover la función del músculo liso. Por lo tanto, S1P, tal vez producido localmente por el miocardio dañado, podría, en parte, ser responsable de la cicatrización de la herida mal adaptada asociada con la remodelación e insuficiencia cardíaca, en particular mediante la activación de los miofibroblastos en el corazón.

Hay tres respuestas generales de las células a S1P: la protección de la muerte celular, la estimulación de la proliferación y la promoción de respuestas migratorias. En consecuencia, la actividad de S1P o su participación en un trastorno particular, línea celular, etc. puede ser evaluada mediante la adaptación de los ensayos de este tipo para este fin. Hay evidencia de que los fibroblastos responden a S1P en las tres formas para promover la curación de heridas. Por ejemplo, en varios de los ejemplos en la sección de Ejemplos siguiente, se presentan los datos que demuestran que S1P contribuye a la remodelación mediante la promoción de la actividad de los miofibroblastos

cardíacos (proliferación, la migración y la expresión de genes de colágeno).

ii. S1P y protección de la muerte celular

Como sucede con muchos tipos de células, los fibroblastos están directamente protegidos de la apoptosis por la adición de S1P y la apoptosis se ve reforzada por inhibidores de SPHK y S1P bloquea la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa resultante. Además, los fibroblastos transfectados con SPHK1 muestran protección frente a la apoptosis, un efecto que puede depender de la translocación de SPHK1 a la membrana plasmática. Está bien establecido que SPHK1 regula al alza Akt, regulando así los miembros de la familia Bcl-2 y protegiendo de la apoptosis. También, S1P<sub>3</sub> es necesario para la fosforilación de Akt en fibroblastos de embriones de ratón (FER). Además, la regulación al alza de SPHK y los consiguientes aumentos en los niveles de S1P protegen a los

cardiofibroblastos de la apoptosis. La ceramida, un metabolito en dirección ascendente de la vía metabólica de S1P, disminuye el potencial de la membrana mitocondrial, lo que se correlaciona con el aumento de la transcripción de las proteínas mitocondriales inductoras de la muerte. Debido al mecanismo de reostato, S1P puede tener el efecto contrario y proteger a los miofibroblastos cardíacos (es decir, fibroblastos completamente diferenciadas en el corazón) de la apoptosis. De hecho, S1P puede incluso activar la autofagia como un mecanismo de protección. Estos efectos podrían ser revertidos por los anticuerpos anti-S1P neutralizantes (u otras moléculas que se unen y actúan para secuestrar S1P).

iii. S1P induce la proliferación, la diferenciación de fibroblastos y promueve la expresión de los genes de colágeno

Se ha demostrado que los fibroblastos responden al tratamiento con S1P aumentando la síntesis de ADN y los fibroblastos transfectados con SPHK1 presentan un aumento de la proliferación celular. Se cree que de forma similar a los efectos que tiene sobre los fibroblastos no cardíacos, S1P estimula la proliferación de cardiofibroblastos (y la posterior diferenciación). Este efecto se produce durante la remodelación y es otro mecanismo que explica el comportamiento de mala adaptación de S1P (en este caso, la formación de cicatrices), particularmente ya que S1P estimula la proliferación en múltiples tipos celulares y tiene como resultado la síntesis de ADN dependiente de SP1 en cardiofibroblastos cultivados (véase el Ejemplo 14, a continuación).

Una característica sobresaliente de los fibroblastos, incluidos los miofibroblastos cardíacos, es su capacidad de expresar colágeno y promover la cicatrización. Es bien sabido que TGFβ regula al alza la producción de colágeno y promueve la fibrosis en el corazón en remodelación. Se ha mostrado que TGFβ, específicamente en los fibroblastos cardíacos, regula al alza varias proteínas pro-fibróticas, convierte los fibroblastos en miofibroblastos y estimula la expresión de proteínas inflamatorias. Curiosamente, TGFβ aumenta el ARNm de SPHK, las proteínas y las concentraciones de S1P asociadas a la actividad y la regulación al alza de TIMP1 por TGFβ está bloqueada por siRNA para SPHK y TIMP1. TIMP1 se expresa generalmente en células de transición entre fibroblastos a miofibroblastos. Además, la transición estimulada por TGFβ a miofibroblastos requiere la fosforilación constitutiva de FAK, que está regulada por la señalización a través S1P<sub>1</sub>. Por lo tanto, la señalización por TGFβ está estrechamente relacionada con S1P. También se ha establecido que los fibroblastos en proliferación no tienen altos niveles de expresión de colágeno, mientras que los fibroblastos no proliferantes pueden ser estimulados para su transición a miofibroblastos y expresar grandes cantidades de alfa actina de músculo liso (αSMA).

iv. S1P induce la migración en fibroblastos

La migración es necesaria para la invasión de fibroblastos cardíacos de un área infartada. S1P está probablemente implicada en este proceso debido a su estimulación profunda de la migración en otros tipos de células y, por lo tanto, puede contribuir a la fibrosis. La reducción de la fibrosis podría reducir la formación de cicatrices y, en el contexto del tejido cardíaco, permitiría mejorar la función cardíaca después de un infarto de miocardio (IM). Se reconoce que es necesaria cierta cicatrización, sin embargo, para evitar la rotura cardíaca en el período inmediatamente posterior al IM, sería deseable iniciar la limitación de la formación de cicatrices después de que haya disminuido el riesgo de rotura cardíaca, particularmente en la zona peri-infarto pero también en la propia zona del infarto en sí.

También se ha demostrado que S1P activa los sistemas de señalización, especialmente Rho y la expresión génica resultante concuerda con sus efectos sustanciales sobre la migración celular. Si bien S1P<sub>1</sub> se requiere para la acción de mitogenicidad y supervivencia de los fibroblastos, la expresión de S1P<sub>1</sub> está asociada con la intensificación de la migración celular.

El ensamblaje de los filamentos contráctiles de actina/miosina está controlado por el sistema Rho/Rac/Cdc42 y la activación de las tres Rho GTPasas es necesaria para que tenga lugar la migración celular. Es necesario que las tres Rho GTPasas se expresen para que se produzca la migración, pero su localización de expresión debe variar para que se produzca la coordinación de sus actividades por separado. Por ejemplo, Rac y Cdc42 son responsables de la formación de protuberancias de tipo lamelipodio y filopodio mediante la polimerización de actina. Es importante destacar que, Rho, Rac y Cdc42 son responsables de la migración celular estimulada por S1P. S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub> y S1P<sub>4</sub> activan Rho a través del acoplamiento con G<sub>13</sub>. Por lo tanto, se cree que la activación de estas Rho GTPasas por S1P es la responsable de la migración de los fibroblastos cardíacos en respuesta a la herida creada por un infarto agudo de miocardio.

Los ejemplos, en la sección de Ejemplos siguiente, proporcionan pruebas sólidas de que los anticuerpos anti-S1P específicos, sensibles pueden actuar como esponjas moleculares para absorber selectivamente y neutralizar S1P de modo que no se pueda unir al complemento de los receptores de S1P en las superficies de los fibroblastos y las células inflamatorias, disminuyendo así la inflamación y la cicatrización. La concentración extracelular eficaz de S1P disminuiría, por lo tanto, mediante una esponja molecular de este tipo de la misma manera que los anticuerpos anti-TNF y señuelos de receptores (Embrel, Remicade) neutralizan el TNF $\alpha$  o el Amc esponja, Avastin, neutraliza el factor de crecimiento pro-angiogénico, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

## 2. Unión de esfingolípidos para un beneficio terapéutico

Los procedimientos y composiciones divulgados en la presente memoria, ya sea basados en monoterapia o terapia de combinación, se dice que están "basados en esfingolípidos" con el fin de indicar que estas terapias pueden cambiar la concentración(es) relativa, absoluta o disponible de los esfingolípidos asociados a determinada enfermedad o trastorno. Ejemplos de esfingolípidos asociados a enfermedades y trastornos, particularmente esfingolípidos asociados a trastornos hiperproliferativos incluyen, pero no se limitan, a ceramida (CER), esfingosina-1-fosfato (S1P) y esfingosina (SPH).

Una forma de controlar la cantidad de esfingolípidos asociados a trastornos proliferativos en un paciente es proporcionando una composición que se una a uno o más esfingolípidos o metabolitos de esfingolípidos. Los anticuerpos y otros compuestos que proporcionan dicha unión pueden, por ejemplo, ser utilizados como "esponjas" terapéuticas que reducen el nivel de una o más especies de esfingolípidos libres en los tejidos y fluidos extracelulares, en particular la sangre. Por "esponja" se entiende que la molécula de unión a esfingolípidos (es decir, una molécula de anti-esfingolípidos), particularmente moléculas de unión a S1P (es decir, una molécula anti-S1P), interacciona específicamente con el esfingolípidos objetivo. Los anticuerpos y otros compuestos que se unen a los receptores celulares de los esfingolípidos pueden utilizarse también (o alternativamente) para competir con y/o prevenir la unión de los esfingolípidos a los receptores.

### A. Anticuerpos que unen esfingolípidos

Un aspecto divulgado en la presente memoria se refiere a anticuerpos que se unen a esfingolípidos, en particular S1P, que se pueden administrar a un paciente para proporcionar tratamiento para un trastorno hiperproliferativo, particularmente un trastorno hiperproliferativo asociado a S1P. Tales métodos pueden ser, a modo de ejemplo no limitativo, (1) modular la concentración efectiva de un esfingolípidos o metabolito específico (por ejemplo, S1P), (2) inhibir estéricamente la unión de un esfingolípidos o un metabolito de esfingolípidos a un receptor celular del mismo, o disminuir la concentración de un esfingolípidos que está disponible para unirse a dicho receptor; (3) inhibir estéricamente la conversión enzimática de un esfingolípidos o un metabolito de esfingolípidos o (4) eliminar el esfingolípidos o un metabolito de esfingolípidos de la sangre in vivo o ex vivo. En realizaciones preferidas, dichos anticuerpos se utilizan como parte de una terapia de combinación, mientras que en otras realizaciones, estos (o uno o más de sus dominios de unión a antígeno) se incorporan a un agente que contiene otra fracción que se une a o de otra manera específicamente interactúa con una especie molecular diferente de la de la fracción anti-esfingolípidos.

El término "anticuerpo" se entiende que abarca una molécula de inmunoglobulina obtenida por generación in vitro o in vivo de una respuesta inmunogénica, e incluye anticuerpos policlonales, mono-específicos y monoclonales, así como receptores de células T y fragmentos y derivados de los mismos. Una "respuesta inmunogénica" es una que da como resultado la producción de anticuerpos dirigidos a uno o más epítopos de un antígeno. Un "epítipo" es un determinante antigénico individual en una molécula.

Los anticuerpos policlonales se generan en una respuesta inmunogénica a un antígeno (muy frecuentemente una proteína o un polipéptido) que tiene muchos epítopos, y por lo tanto, generalmente incluyen una población de diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes epítopos en el antígeno. Los métodos para producir anticuerpos policlonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Cooper et al, Sección III del Capítulo 11 en: Short Protocols in Molecular Biology, 2<sup>a</sup> Ed., Ausubel et al, eds, John Wiley and Sons, New York, 1992, páginas 11-37 a 11-41).

Los anticuerpos mono-específicos se generan en una respuesta humoral a un polipéptido corto (típicamente, de 5 a 20 aminoácidos) inmunogénico que corresponde a unos pocos epítopos (preferiblemente uno) aislados de la proteína de la que se deriva. Una pluralidad de anticuerpos mono-específicos incluye una variedad de diferentes anticuerpos dirigidos a una porción específica de la proteína, es decir, a una secuencia de aminoácidos que contiene al menos uno, preferiblemente sólo un, epítipo. Los métodos para producir anticuerpos mono-específicos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Id., Páginas 11-42 a 11-46).

Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo específico que reconoce un único epítipo específico de un antígeno. En una población de unas moléculas de anticuerpos monoclonales, cada molécula de anticuerpo es idéntica a las otras en la población. Para aislar un anticuerpo monoclonal, se identificó por primera vez una línea celular clonal que expresa, exhibe y/o segrega un anticuerpo monoclonal particular. Esta línea celular clonal se puede utilizar para producir los anticuerpos monoclonales deseados. Los métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados por las mismas, por tanto, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo,

Fuller et al, sección II del capítulo 11 en: Short Protocolos in Molecular Biology, 2<sup>a</sup> Ed., Ausubel et al, eds, John Wiley and Sons, Nueva York, 1992, páginas 11-22 a 11/11/36).

Los receptores de células T (TCR) son una clase distinta de proteínas que están genéticamente y estructuralmente relacionadas con anticuerpos. Las proteínas TCR pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tienen estructuras moleculares similares a las de los anticuerpos. Al igual que los anticuerpos, los TCR reconocen específicamente (es decir, específicamente y unen) ligandos específicos. Los complejos de TCR se presentan en las células T y unen antígenos específicos con el propósito de desencadenar los acontecimientos moleculares asociados a la diferenciación y activación de las células T. Al igual que los anticuerpos, los TCR reconocen antígenos particulares. Sin embargo, debido a las diferencias en las estructuras precisas de las porciones de las proteínas TCR que se unen a ligandos y las secuencias de aminoácidos asociados con esas estructuras, así como los diferentes mecanismos mediante los cuales los genes que codifican una proteína se diversifican por reorganización y mutación.

Los fragmentos de anticuerpos y derivados son proteínas que se derivan de anticuerpos y receptores de células T y que conservan la capacidad de reconocer específicamente el ligando reconocido por el anticuerpo "original" o TCR. Los fragmentos preferidos incluyen fragmentos Fab (es decir, un fragmento de anticuerpo que contiene el dominio de unión al antígeno y comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada puentado por un puente disulfuro); Fab' (un fragmento de anticuerpo que contiene un único anti-dominio de unión que comprende un Fab y una porción adicional de la cadena pesada a través de la región de bisagra), F(ab')<sub>2</sub> (dos moléculas Fab' unidas por puentes disulfuro entre cadenas en las regiones de bisagra de las cadenas pesadas; las moléculas Fab' pueden ir dirigidas hacia los mismos o diferentes epítomos) y un Fab biespecífico (una molécula Fab que tiene dos dominios de unión al antígeno, cada uno de los cuales puede ir dirigido a un epítomo diferente).

Los anticuerpos de cadena sencilla (scFv) comprenden una región variable, determinante de la unión al antígeno de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas entre sí por una cadena de 10-25 aminoácidos. Patentes US-5.260.203; 5.869.620; 5.455.030; 5.518.889; 5.534.621; 4.946.778; 6.025.165 y 6.027.725.

Los complejos de anticuerpos de cadena sencilla también están dentro del ámbito de la invención e incluyen, pero no se limitan a, un Fv unido por puentes disulfuro, o dsFv (la región variable determinante de la unión a antígeno de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unidas entre sí por un enlace disulfuro); un sFv biespecífico (un scFv o una molécula dsFv que tiene dos dominios de unión a antígeno, cada uno de los cuales puede ir dirigido a un epítomo diferente); un diacuerpo (un scFv dimerizado formado cuando el dominio VH de un primer scFv se ensambla con el dominio VL de un segundo scFv y el dominio VL del primer scFv se ensambla con el dominio VH del segundo scFv; las dos regiones de unión a antígeno del diacuerpo pueden ir dirigidas hacia los mismos o diferentes epítomos), y un triacuerpo (un sFv trimerizado, formado de una manera similar a un diacuerpo, pero en el que se crean tres dominios de unión a antígeno en un solo complejo; los tres dominios de unión a antígeno pueden ir dirigidos hacia los mismos o diferentes epítomos).

El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos de ingeniería genética y/o anticuerpos producidos por técnicas de ADN recombinante y anticuerpos "humanizados". Los anticuerpos humanizados se han modificado, por manipulación genética y/o tratamiento *in vitro* para que sean más humanos, en términos de secuencia de aminoácidos, patrón de glicosilación, etc., con el fin de reducir la antigenicidad del anticuerpo o fragmento del anticuerpo en un animal al cual el anticuerpo está destinado a ser administrado.

#### B. Un anticuerpo monoclonal anti-S1P preferido

Se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal anti-S1P bioespecífico preferido (Acm anti-S1P) y ha sido depositado con el número de acceso ATCC asignado 306D326.1# 26. Este anticuerpo se puede utilizar como una esponja molecular terapéutica para absorber selectivamente S1P y de esta manera reducir las concentraciones extracelulares de S1P *in vivo* efectivas para el propósito de tratar trastornos hiperproliferativos asociados con la actividad de S1P. Esto puede resultar en la reducción del volumen tumoral y el potencial metastásico, así como el bloqueo simultáneo de la formación de nuevos vasos sanguíneos que de otro modo pueden alimentar al tumor en crecimiento. Este anticuerpo (y las moléculas que tienen una actividad equivalente) también se pueden utilizar para tratar otros trastornos hiperproliferativos afectados por S1P, incluyendo la proliferación no deseada de células endoteliales, como ocurre, por ejemplo, en la degeneración macular asociada a la edad y la endometriosis, trastornos relacionados con la fibrogénesis y en muchos tipos de cáncer. Además, la capacidad de S1P para proteger las células de la apoptosis puede revertirse por los agentes, tales como el anticuerpo, aumentando así la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos pro-apoptóticos estándar.

#### 3. Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la presente descripción se dirige a composiciones, incluyendo, pero sin limitación, composiciones farmacéuticas y/o biológicas. Según la invención, una "composición" se refiere a una mezcla que comprende al menos un vehículo, preferiblemente un vehículo fisiológicamente aceptable y uno o más agentes terapéuticos según la invención. El término "vehículo" define un compuesto químico que no inhibe ni previene la incorporación de agentes terapéuticos en las células o tejidos. Un vehículo típicamente es una sustancia inerte que permite formular o

incorporar en un compuesto un principio activo en una forma farmacéutica adecuada (por ejemplo, una píldora, una cápsula, un gel, una película, un comprimido, una micropartícula (por ej., una microesfera), una solución, etc.). Un "vehículo fisiológicamente aceptable" es un vehículo adecuado para su uso en condiciones fisiológicas que no anula (reduce, inhibe o evita) la actividad biológica y las propiedades del compuesto. Por ejemplo, el dimetilsulfóxido (DMSO) es un vehículo, ya que facilita la asimilación de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo fisiológicamente aceptable, preferiblemente un vehículo farmacéuticamente o veterinariamente aceptable, en el que está dispuesto el agente terapéutico. Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición en la que el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable, mientras que una "composición veterinaria" es aquella en la que el vehículo es un vehículo veterinariamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo veterinariamente aceptable" incluye cualquier medio o material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el vehículo puede ser administrado a un organismo, junto con un agente terapéutico, composición o compuesto, sin causar ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de una manera perjudicial con el complejo o con cualquiera de sus componentes o el organismo. Ejemplos de reactivos farmacéuticamente aceptables se proporcionan en la Farmacopea de los Estados Unidos, The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. 1990.

Las composiciones divulgadas en la presente memoria pueden comprender, además, otros componentes químicos, tales como diluyentes y excipientes. Un "diluyente" es un compuesto químico diluido en un disolvente, preferiblemente un disolvente acuoso, que facilita la disolución del agente terapéutico en el disolvente, y que también puede servir para estabilizar la forma biológicamente activa del agente terapéutico o uno o más de sus componentes. Las sales disueltas en soluciones tamponadas se usan como diluyentes en la técnica. Por ejemplo, los diluyentes preferidos son soluciones tampón que contienen una o más sales diferentes. Una solución tamponada preferida es solución salina tamponada con fosfato (particularmente en conjunción con las composiciones destinadas a la administración farmacéutica), ya que imita las condiciones salinas de la sangre humana. Dado que las sales tampón pueden controlar el pH de una solución a bajas concentraciones, un diluyente tamponado rara vez modifica la actividad biológica de un agente terapéutico.

Un "excipiente" es cualquier sustancia más o menos inerte que se pueda añadir a una composición para conferir una propiedad adecuada, por ejemplo, una consistencia adecuada o para formar un medicamento. Excipientes y vehículos adecuados incluyen, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol o preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, agar, pectina, goma de xantano, goma de guar, goma de algarrobo, ácido hialurónico, almidón de caseína de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, poliacrilato, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, también se pueden incluir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato sódico. Otros excipientes y vehículos adecuados incluyen hidrogeles, hidrocoloides gelificables y quitosán.

Las composiciones se pueden formular de cualquier manera adecuada. Los agentes terapéuticos pueden dispersarse uniformemente (homogéneamente) o no uniformemente (heterogéneamente) en el vehículo. Las formulaciones adecuadas incluyen formulaciones sólidas y líquidas. Las formulaciones secas incluyen polvos secados por congelación y polvos liofilizados, que son particularmente adecuados para la administración en aerosol a los senos nasales o pulmones, o para el almacenamiento a largo plazo, seguido por la reconstitución en un diluyente adecuado antes de la administración. Otras formulaciones secas preferidas incluyen aquellas en las que una composición de acuerdo con la invención se comprime en forma de comprimido o píldora adecuada para la administración oral o combinarse en una formulación de liberación sostenida. Cuando la composición está destinada para la administración oral, pero el agente terapéutico se debe administrar en el epitelio intestinal, se prefiere que la formulación esté encapsulada con un recubrimiento entérico para proteger la formulación y prevenir la liberación prematura de los agentes terapéuticos incluidos en el mismo. Como apreciarán los expertos en la técnica, las composiciones de la invención pueden formularse en cualquier forma farmacéutica adecuada. Las píldoras y los comprimidos representan algunas de estas formas farmacéuticas. Las composiciones también se pueden encapsular en cualquier cápsula u otro material de revestimiento adecuado, por ejemplo, por compresión, inmersión, revestimiento en bandeja, secado por pulverización, etc. Cápsulas adecuadas incluyen aquellas hechas de gelatina y almidón. A su vez, dichas cápsulas se pueden recubrir con uno o más materiales adicionales, por ejemplo, un recubrimiento entérico, si se desea. Las formulaciones líquidas incluyen formulaciones acuosas, geles y emulsiones.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles pueden ser utilizadas por ejemplo, mediante inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal o subcutánea. Las soluciones estériles también pueden administrarse por vía intravenosa. El principio activo puede prepararse como una composición sólida estéril que puede disolverse o suspenderse en el momento de la administración usando agua estéril, solución salina u otro medio inyectable estéril apropiado. Los vehículos están concebidos para incluir aglutinantes necesarios e inertes, agentes de suspensión, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes, conservantes, colorantes y recubrimientos.

Los expertos en la técnica apreciarán que cuando las composiciones divulgadas en la presente memoria se administran como agentes para lograr un resultado biológico deseado en particular, que puede incluir un efecto(s) terapéutico o protector (incluyendo la vacunación), puede ser necesario combinar los agentes terapéuticos con un vehículo farmacéutico adecuado. La elección del vehículo farmacéutico y la preparación del agente terapéutico como

un agente terapéutico o de protección dependerá del uso y modo de administración previstos. Formulaciones y métodos de administración de agentes terapéuticos adecuados incluyen aquellos para la administración oral, pulmonar, nasal, bucal, ocular, dérmica, rectal o vaginal.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar en forma de un sólido, una solución, una emulsión, una dispersión, una micela, un liposoma, y similares, en las que la composición resultante contiene uno o más de los compuestos, como principio activo, mezclado con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para las aplicaciones enterales o parenterales. El principio activo puede combinarse, por ejemplo, con los vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos habituales para comprimidos, gránulos, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones y cualquier otra forma adecuada para su uso. Los vehículos que pueden ser utilizados incluyen glucosa, lactosa, manosa, goma de acacia, gelatina, manitol, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, triglicéridos de longitud de cadena media, dextranos y otros vehículos adecuados para su uso en la fabricación de preparaciones, en forma sólida, semisólida, o líquida. Además, se pueden usar excipientes como estabilizantes, espesantes, colorantes y perfumes.
- 10
- 15 Un kit terapéutico como el divulgado en la presente memoria comprende un reactivo como el divulgado en la presente memoria con uno o más componentes adicionales, incluyendo viales u otros recipientes para el almacenamiento de una composición de acuerdo con la invención, instrucciones de uso y materiales de acondicionamiento.

### Ejemplos

- 20 Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención y para ayudar a los expertos en la técnica en la puesta en práctica de la invención. Dichos ejemplos no deben considerarse, que en modo alguno, limiten el ámbito de la invención.

Los ejemplos de esta sección de Ejemplos demuestran resultados favorables de estudios de farmacocinética y toxicología realizados en modelos animales de tumores humanos y animales. También se describe el grado de respuesta de múltiples líneas de células tumorales a S1P, incluyendo, pero sin limitación, células HeLa (adenocarcinoma cervical humano), U-87 (glioblastoma cerebral humano), U266 (mieloma múltiple humano), A549 (carcinoma de pulmón humano), U937 (linfoma histocístico humano), MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria humana), SKOV3 (cáncer de ovario humano), OVCAR3 (cáncer de ovario humano), MDA MB 231 (cáncer de mama humano), MDA MB 468 (cáncer de mama humano), H929 (mieloma humano), RPMI-8226 (mieloma múltiple humano), U937 (linfoma humano), SKBR-3 (cáncer de mama humano) y células HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano). Estas líneas de células tumorales representan un espectro de subtipos histológicos, aberración genética y niveles de los receptores y enzimas que producen y metabolizan S1P. Esto incluye proliferación celular, motilidad, invasión, apoptosis, y, para un grupo selecto, la producción de factores angiogénicos. Se demuestra también que muchas líneas celulares tumorales son también sensibles a S1P en sus capacidades para escapar a la apoptosis inducida por los agentes quimioterapéuticos representativos doxorubicina y paclitaxel.

25

30

35

La protección de la apoptosis inducida por S1P también se puede invertir en la presencia de un agente anti-S1P, el Acm anti-S1P. Una característica importante de los cánceres metastásicos es que las células tumorales escapan a la inhibición por contacto y pueden migrar fuera de su tejido de origen. También se describe la potente capacidad de S1P para inducir la invasión de células en múltiples líneas celulares tumorales, como es la capacidad del Acm anti-S1P mAb para inhibir el potencial metastásico de S1P. En un número limitado de tipos de células, S1P promueve la proliferación celular por encima de los ya considerables niveles basales. Es importante destacar que, los estudios de xenoinjertos *in vivo* demuestran que el Acm anti-S1P reduce el volumen de los tumores en ratones que recibieron una variedad de células de cáncer humano y una línea celular de melanoma de ratón (B16-F10).

40

S1P ha mostrado que promueve la angiogénesis por la migración de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios descritos a continuación confirman que S1P estimula la formación de túbulos de tipo capilar *in vitro* e *in vivo*. Además, este proceso puede ser inhibido por el Acm anti-S1P. Por ejemplo, los ensayos con tapón de Matrigel revelan que el Acm anti-S1P es anti-angiogénico. Esto fue confirmado *in vitro* usando HUVEC. Por lo tanto, se ha mostrado que S1P no sólo protege a las HUVEC de la apoptosis inducida por doxorubicina y paclitaxel, sino que también estimula la migración de HUVEC y la formación de vasos sanguíneos. Además, se presentan ejemplos que demuestran la capacidad del Acm anti-S1P para reducir la angiogénesis tumoral *in vivo* utilizando un modelo de aloinjerto B16-F10. Todos estos efectos se atenúan por el Acm anti-S1P.

45

50

Además de la S1P producida por las propias células tumorales, el suero es una fuente rica de este importante factor tumorigénico. Los agentes anti-S1P, tales como un Acm anti-S1P, pueden neutralizar la S1P presente no sólo en el suero, sino también en las proximidades de tumores sólidos.

55

Se presentan ejemplos para ilustrar los efectos pleiotrópicos de S1P como un factor de crecimiento tumorigénico en varios tumores derivados de líneas de células humanas, lo que sugiere que nuestro Acm anti-S1P puede ser utilizado con éxito en una gran variedad de tipos de cáncer. Además, los datos presentados demuestran que los

tumores derivados de ratón se pueden tratar con el Acm anti-S1P, lo que sugiere una aplicación veterinaria del anticuerpo.

### Ejemplo 1

#### El Acm anti-S1P solo disminuye la progresión del tumor

- 5 La eficacia antitumoral de un anticuerpo monoclonal (Acm) anti-S1P se evaluó en dos modelos de cáncer de mama ortotópico y un modelo de cáncer de ovario. Los tumores se desarrollaron mediante la inyección de células tumorales humanas MDA 231 MB en las almohadillas de grasa mamaria de ratones desnudos (NCr nu/nu) utilizando protocolos estándar. Después de 10 días, cuando se habían formado tumores sólidos (~ 100 mm<sup>3</sup>), se iniciaron
- 10 tratamientos intraperitoneales de Acm anti-S1P o vehículo solo. El Acm anti-S1P se administró 25 mg/kg por vía intraperitoneal (ip) cada dos días en solución salina. Los tratamientos se administraron cada dos días durante toda la duración del estudio. También se determinaron los volúmenes de los tumores y se registraron en días alternos. El estudio se concluyó y los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron su tamaño máximo tal como se define por las normas IACUC (alrededor de 1,5 cm<sup>3</sup>). Los tumores se recogieron, se midieron y se procesaron para las evaluaciones inmunohistoquímicas de cambios micro-vasculares.
- 15 Se ha demostrado la eficacia del Acm anti-S1P en la reducción de volumen del tumor con el tiempo. La capacidad del Acm anti-S1P para reducir el volumen del tumor fue evidente sólo después de que los tumores alcanzaron aproximadamente 400 mm<sup>3</sup>. En este punto, los tumores de los animales de control continuaron creciendo, mientras que los tumores de los animales tratados con anti-S1P casi dejaron de crecer. Al final del estudio, los volúmenes de los tumores se redujeron en un 60% (p<0,001 por ANOVA) en los animales tratados con anticuerpos. El Acm anti-S1P redujo significativamente los pesos finales del tumor en un promedio de 40% en comparación con los tumores de los animales tratados de control.
- 20

También se han obtenido datos de eficacia *in vivo* con células humanas de cáncer de mama MDA MB 468 en un modelo ortotópico de almohadilla de grasa mamaria equivalente. En este modelo, se observó una reducción promedio del 40% en el volumen tumoral promedio para los animales tratados con anticuerpos. La reducción en el tamaño de los tumores de los animales tratados con el Acm anti-S1P se correspondía con la reducción de los niveles séricos del factor pro-angiogénico y tumorigénico, IL-8. Así, en ambos modelos de xenoinjerto ensayados, el anticuerpo anti-S1P inhibió notablemente el crecimiento del tumor.

25

### Ejemplo 2

#### El Acm anti-SP1 inhibe la angiogénesis del tumor *in vivo*

- 30 Para investigar la capacidad del Acm anti-S1P para neutralizar los efectos pro-angiogénicos de S1P, se usó un ensayo de tampón de Matrigel *in vivo*. Este ensayo es un modelo animal bien establecido para la angiogénesis tumoral utilizando Matrigel, una mezcla patentada de restos tumorales, incluyendo las membranas basales derivadas de tumores de ratón. Cuando Matrigel se inyecta por vía subcutánea (sc) en un animal, se forma un 'tapón'. Tras la adición de factores angiogénicos, el tapón es invadido por células endoteliales vasculares, que seguidamente forman
- 35 vasos sanguíneos similares a capilares. Matrigel se pueden preparar ya sea solo o mezclado con factores de crecimiento recombinantes (RGF), tales como FGF o VEGF, como compuestos pro-angiogénicos, a continuación se inyecta por vía sc en la espalda de ratones hembra C57B1/6N de 6 semanas de edad. La S1P endógena de la sangre y del tejido circundante se podía suministrar al tapón mediante un estímulo adicional pro-angiogénico. Basándose en las características funcionales *in vivo* del anticuerpo (ver más abajo), se presumió que el tratamiento de los ratones con el Acm anti-S1P reduciría los niveles de S1P en suero y tejido disponibles y, en consecuencia, reduciría la concentración de la S1P endógena disponible para el tapón. En estos experimentos se estudió la capacidad del anticuerpo para reducir la angiogénesis en un tapón estimulado de forma óptima (factores de crecimiento de proteínas añadido, más S1P endógena). Un grupo de ratones que recibió Matrigel que contenía hGF también recibió inyecciones intraperitoneales (ip) del Acm anti-S1P cada 48 horas comenzando el día 1 antes de la implantación de Matrigel. Cada grupo de tratamiento (Matrigel, Matrigel más hGF o Matrigel más hGF con tratamiento con Acm) consistía en un mínimo de seis ratones. Después de 10 días, los ratones se heparinizaron y se inyectaron con la lectina fluorescente, Isolectina B4-FITC, que se une a moléculas de adhesión expresadas por las células endoteliales vasculares. Los tapones fueron extirpados. El examen visual de los tapones reveló que los tapones de control (sólo Matrigel) eran incoloros, mientras que los tapones que contenían hGF habían sufrido
- 45 claramente angiogénesis, como se indica por el aspecto rojo de la sangre. Los tapones de los animales tratados con el anticuerpo Acm anti-S1P y que contenía hGF eran incoloros, lo que sugiere una inhibición de la micro-vascularización. Los tapones se embebieron a continuación en medio de congelación OCT y se seccionaron. La densidad micro-vascular se determinó cualitativamente por los vasos manchados de lectina-FITC, como se muestra en la Figura 5. La tinción de los vasos sanguíneos fue esporádica en los tapones control (sin tratamiento), mientras que los tapones que contenían hGF mostraban signos significativos de vascularización (foto media del panel C). Los tapones de los ratones tratados con el Acm anti-S1P mostraban una reducción significativa en la formación de vasos sanguíneos en comparación con los tapones de hGF de ratones no tratados (sin Acm). La cuantificación de los vasos teñidos reveló una disminución de 11 veces en la neo-vascularización de los tapones que contenían hGF de animales tratados con el anticuerpo en comparación con los animales no tratados. Esta evaluación demuestra
- 50
- 55

además la capacidad de S1P del suero endógeno y del tejido para aumentar la micro-vascularización, así como la capacidad de los anticuerpos Acm anti-S1P para neutralizar los efectos pro-angiogénicos de S1P endógena *in vivo*.

Estos resultados demuestran los efectos anti-angiogénicos del Acm anti-S1P *in vivo* y los dramáticos efectos del Acm anti-S1P en la reducción de la progresión del tumor sin el beneficio de agentes quimioterapéuticos citotóxicos. Sin pretender adherirse a una teoría particular, estos datos revelan que los efectos anti-tumorigénicos del Acm anti-S1P podrían deberse a la mitigación de los efectos angiogénicos de S1P que normalmente promoverían la progresión del tumor. Por lo tanto, algunos tratamientos eficaces contra el cáncer serán el resultado de los efectos aditivos del agente anti-S1P en combinación con uno o más de otros agentes citotóxicos. A continuación se describen los experimentos *in vitro* e *in vivo* que demuestran los efectos antitumorales aditivos de un tratamiento de combinación.

### Ejemplo 3

#### Farmacocinética y toxicología *in vivo*

Antes de iniciar los estudios *in vivo*, se determinaron en ratones las características toxicológicas y farmacocinéticas del Acm anti-S1P. La semivida del anticuerpo se midió para determinar la dosis óptima a administrar a los animales para mantener un nivel en sangre razonable del Acm anti-S1P. Se administró a los ratones 25 mg/kg del Acm anti-S1P por vía intravenosa (iv) y se sangraron en los puntos de tiempo designados. Se usó un ELISA competitivo que empleaba un Acm anti-S1P marcado con biotina para determinar la concentración del anticuerpo restante en la sangre del ratón entre 20 min y 120 horas después de la dosis en bolo de anticuerpo. La Figura 6 demuestra que la semivida media en suero del Acm fue de aproximadamente 20-25 horas. Además de las inyecciones iv, a los ratones se les administró una dosis en bolo de Acm anti-S1 por inyección intraperitoneal (ip). Después de 20 minutos, más del 95% del anticuerpo apareció en el torrente sanguíneo. Tomados en conjunto, estos datos indican que a los ratones se les puede administrar efectivamente el Acm anti-S1P por vía ip o iv.

Debido a la naturaleza pleiotrópica de S1P, se investigaron los posibles efectos adversos sobre las funciones fisiológicas que podrían estar causados por una reducción de la S1P sistémica como resultado del tratamiento con el Acm anti-S1P. Los ratones se trataron con 1, 3, 10, 30 o 50 mg/kg del Acm anti-S1P o del vehículo (PBS) durante siete días consecutivos por inyección en la vena caudal. Debido a la prolongada semivida del anticuerpo, las simulaciones de la pauta indicaron que los animales acumulaban más del doble de la cantidad de anticuerpo en los 7 días. Veinticuatro horas después del tratamiento final, se sacrificaron los ratones, se recogió el fluido biológico y se recogieron los órganos. Incluso en la dosis más alta, todos los análisis químicos y el hematograma completo estaban dentro de los intervalos normales. Además, el examen histopatológico realizado por un patólogo veterinario especialista no reveló lesiones ni otros cambios patológicos en el hígado, riñones, corazón, pulmones o bazo de los ratones de cualquier grupo de tratamiento. A lo largo de la duración del estudio, los ratones de todos los grupos de tratamiento consumieron cantidades similares de alimentos y agua y se socializaron de forma similar a la de los animales de control. Los pesos corporales y los niveles de actividad también fueron normales. Por lo tanto, en todas las dosis analizadas, incluyendo 50 mg/kg, el anticuerpo parece ser bien tolerado.

La información de los estudios farmacocinéticos piloto y de toxicidad proporcionaron una idea de cómo administrar a los animales en los estudios de eficacia. Una simulación de la administración de 10 mg/kg de Acm anti-S1P cada tercer día demuestra la presencia constante del anticuerpo en ratón que no se acumula apreciablemente con el tiempo.

### Ejemplo 4

#### Características de los anticuerpos

Una característica funcional importante de un anticuerpo es su especificidad hacia su antígeno, es decir, si este reacciona específicamente con su diana prevista. En un ELISA competitivo en el que se ensayaba el Acm anti-S1 frente a una muestra de S1P de referencia (obtenida de Avanti Polar Lipids y confirmado por HPLC y espectroscopia de masas), así como varios otros controles lípidos, el anticuerpo no mostró reactividad cruzada con esfingosina (SPH), el precursor metabólico inmediato de S1P. Por otra parte, el Acm anti-S1 no reconoció el ácido lisofosfático (LPA) ni la esfingosilfosforilcolina (SPC). Tanto el LPA como el SPC son estructuralmente similares a S1P.

Otra característica funcional importante de un buen anticuerpo terapéutico es que puede reconocer la diana (es decir, S1P) en el intervalo fisiológico. Los estudios que utilizan la técnica de HPLC estándar en la industria para la medición de S1P en suero revelaron que los niveles de S1P en suero normales están dentro del intervalo de 400-700 pmol/ml, mientras que los pacientes con arteriopatía coronaria significativa muestran unos niveles séricos de S1P más altos, en el intervalo de 900-2.500 pmol/ml. Los datos indican que la ascitis de pacientes de ovario contienen una gran cantidad de S1P cercana a los niveles séricos de S1P. Se ha demostrado el intervalo dinámico del Acm anti-S1P usado en estos ejemplos y se ha indicado que el anticuerpo es capaz de reconocer S1P tanto en concentraciones de S1P normales como clínicamente relevantes. En consecuencia, el Acm anti-S1P tiene un intervalo dinámico que es sensible y específico, es decir, es "específicamente reactivo" con su diana prevista. Una comparación entre la medición por HPLC estándar de la industria de S1P en suero humano de un voluntario normal y las mediciones basadas en ELISA utilizando el Acm anti-S1P mostró una buena correspondencia entre los dos

métodos, validando así el uso de un ELISA como una plataforma para la determinación precisa de S1P .

Una característica importante adicional de un anticuerpo es su capacidad para reconocer su ligando en un entorno *in vivo*. En consecuencia, se estudió la capacidad de los anticuerpos anti-S1P mAb para reconocer y absorber selectivamente S1P de suero humano y de ratón en un ensayo *in vitro* utilizando tanto la radiactividad como el análisis de espectrometría de masas. El Acm era suficientemente capaz de absorber hasta el 88% y el 77% del <sup>3</sup>H-S1P añadido a PBS y suero de ratón, respectivamente. La diferencia en la capacidad del Acm para absorber niveles similares de <sup>3</sup>H-S1P en el suero de ratón en comparación con el control (PBS) era también probablemente debida a la unión del Acm a la S1P endógena, la cual está presente en grandes concentraciones en suero de ratón. Estos datos son consistentes con los bioensayos celulares *in vitro* realizados en suero más los experimentos de eficacia *in vivo*, lo que demuestra que el Acm puede neutralizar efectivamente S1P en el suero.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran el éxito del desarrollo de un anticuerpo monoclonal bioespecífico contra S1P que es a la vez específico y sensible. Por lo tanto, el Acm y otros agentes capaces de reaccionar específicamente con S1P, se pueden utilizar terapéuticamente como una "esponja" o "sumidero" molecular para absorber de manera eficiente y selectiva S1P a partir de suero, reduciendo así su concentración efectiva en los fluidos extracelulares *in vivo*. Además, el Acm anti-S1P (y como reactivos) se puede utilizar como un reactivo de detección en un ensayo para detectar (cuantitativamente, semi-cuantitativamente o cualitativamente) los niveles de S1P (u otros analitos diana) en muestras biológicas (por ejemplo, muestras de tejido (por ejemplo, de biopsias) o fluidos corporales (por ejemplo, sangre, ascitis, suero, linfa, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.). La evaluación de la S1P como un biomarcador podría ser utilizado conjuntamente con el perfil genómico de los niveles de receptor de S1P en tejido y los niveles de SPHK para estratificar los pacientes por dependencia de S1P para el crecimiento tumoral. Dichos ensayos tendrán aplicación en plataformas "teranósticas" en las que se mediría el suero, ascitis o material de biopsia tumoral de un paciente para determinar el contenido de S1P, preferiblemente junto con análisis genómico, con lo que podrá predecirse qué pacientes serían los que se beneficiarán más de un tratamiento terapéutico que emplea el reactivo de detección formulado como un agente terapéutico en una terapia posteriormente administrada.

### Ejemplo 5

#### El Acm anti-S1P aumenta la muerte de las células tumorales inducida por quimioterapéuticos

Además de las propiedades pro-angiogénicas de S1P (véase más arriba), se ha demostrado que las acciones de S1P en la promoción del crecimiento del tumor se pueden atribuir a la capacidad de la molécula para promover directamente la proliferación celular y para proteger a las células contra los agentes quimioterapéuticos pro-apoptóticos. La capacidad de S1P para bloquear la regulación al alza y la activación del efector terminal de apoptosis, la caspasa-3, se ha estudiado en varias líneas de células tumorales cuando se exponen a niveles clínicamente relevantes de los agentes quimioterapéuticos, paclitaxel (*Taxol*) y doxorubicina (*Andriamycin*). Se ha demostrado la capacidad de S1P para proteger las células A549, HT-29, U266BL y HeLa de la apoptosis provocada por estos agentes quimioterapéuticos. Además, se ha demostrado que paclitaxel y doxorubicina inducían potentemente la activación de la caspasa-3 en un 50-1000% después de 48 h de tratamiento en medios que contienen 10% de suero. En un intento de promover condiciones semejantes a los niveles fisiológicos de S1P, el 10% de suero fue suplementado con S1P adicional (100 nM) y a continuación, las células fueron tratadas con agentes citotóxicos. En comparación con las células tratadas con 10% de suero, las células suplementadas con S1P exógeno adicional fueron protegidas de la apoptosis inducida por paclitaxel y doxorubicina. Esto fue demostrado por la reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en la actividad de la caspasa observada en la presencia de esfingolípidos añadidos. Es importante destacar que, el Acm fue eficaz en mitigar los efectos protectores de S1P en la presencia de los agentes quimioterapéuticos. Incluso en la ausencia de S1P añadido, la activación de la caspasa inducida por paclitaxel y doxorubicina había aumentado por el Acm anti-S1P (25% y 50-200% de aumento, respectivamente), lo que indica que el efecto anti-apoptótico de protección de la S1P endógena se había eliminado por la absorción selectiva de anticuerpos de S1P presentes en el suero. Teniendo en cuenta que el suero tiene S1P endógena sustancial, la eficacia del anticuerpo en ausencia de S1P añadido (tercer conjunto de barras) muestra que los niveles endógenos de S1P en el suero fueron suficientes para proporcionar una cierta protección contra la doxorubicina o la muerte celular inducida por paclitaxel.

La especificidad del Acm anti-S1P se demostró en experimentos de control utilizando un mediador lipídico bioactivo estructuralmente similar y un anticuerpo monoclonal no específico emparejado por isotipo. Los experimentos que utilizan las líneas celulares A549, HT-29 y U266BL, LPA no conseguía reducir la activación de la caspasa. Por otra parte, el anticuerpo monoclonal no específico no pudo neutralizar la respuesta a S1P, lo que demuestra la especificidad del Acm anti-S1P en atenuar los efectos de S1P.

Datos similares han demostrado los efectos anti-apoptóticos de S1P en células U266BL, MCF-7 y HT-29. Sin embargo, no todas las líneas de células tumorales responden a la S1P. Por ejemplo, las células de melanoma de ratón B 16-F10, de linfoma humano U937 y de carcinoma de ovario humano MDA MB 2774 no respondían a S1P cuando se evaluaba la capacidad del mediador de lípidos para proteger a aquellos tipos de células de la apoptosis inducida por doxorubicina o paclitaxel. Por otra parte, el Acm anti-S1P no aumentaba el potencial destructor de los agentes quimioterapéuticos, lo que demuestra la falta de efecto que ejerce la S1P en estas líneas de células

tumorales.

### Ejemplo 6

#### El Acm anti-S1P inhibe la liberación de citocinas y VEGF promotores del crecimiento tumoral

5 En modelos animales, la expresión de la interleucina-6 y 8 está asociada con un aumento de la tumorigenicidad, formación de ascitis, angiogénesis e invasividad de las células de cáncer de ovario. En pacientes con cáncer de ovario, los niveles séricos de IL-6 están elevados en varias magnitudes. Tomados en conjunto, estos estudios indican que la IL-6 es un importante modulador o, al menos, un indicador de la progresión del cáncer de ovario. Por estas razones, se decidió investigar si un anticuerpo monoclonal anti-S1P podría reducir la producción de IL-6 como una medida de la capacidad del anticuerpo para reducir la progresión del cáncer de ovario. Para estos estudios, se demostró que S1P 10 $\mu$ M podría estimular la liberación de IL-6 a partir de células de cáncer de ovario. Se recogieron sobrenadantes de cultivo de células de cáncer de ovario OVCAR3, tratados con o sin S1P y se analizaron para determinar la liberación de IL-6 en los medios de acondicionamiento celular usando un ELISA. Como se ha demostrado, S1P aumentó la expresión de IL-6 en un promedio de 275% en comparación con las células no tratadas. Para las células pretratadas con el Acm anti-S1P, la expresión de IL-6 se había reducido significativamente. Cantidades crecientes del Acm (0,01 a 10  $\mu$ g/ml) provocaban una pérdida dependiente de la dosis de la expresión de IL-6. Se obtuvieron resultados significativos similares utilizando otros dos factores neo-vascularización, IL-8 y el VEGF, y utilizando varios linajes de células tumorales. Estos datos muestran que el bloqueo de la liberación del factor de crecimiento es un efecto adicional de los agentes anti-S1P.

### Ejemplo 7

#### El Acm anti-S1P reduce los aumentos estimulados por S1P en la proliferación de las células cancerosas

20 La capacidad de S1P para aumentar la proliferación de líneas celulares tumorales derivadas de seres humanos, incluyendo las células A549, HT-29, MCF-7 y HeLa, se ha demostrado mediante estudios de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. La síntesis de ADN aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) en las células tratadas con S1P 10 nM en comparación con las células control no tratadas en cada una de estas líneas celulares de cáncer. A pesar de que las células derivadas de tumores normalmente tienen altos niveles basales de proliferación, S1P parece aumentar la proliferación en la mayoría de las líneas celulares tumorales. Es importante destacar que, el aumento de la síntesis de ADN estimulada por S1P fue mitigado por la adición de 1  $\mu$ g/ml del Acm anti-S1P. Se obtuvieron datos similares con las líneas de células tumorales el OVCAR3, MDA MB 273 y MDA 468 MB, usando tinción con violeta cristal.

### Ejemplo 8

#### El Acm anti-S1P disminuye el potencial metastásico de las células tumorales estimuladas por S1P

30 Una característica importante de los cánceres metastásicos es que las células tumorales adquieren la capacidad de migrar e invadir tejidos. S1P ha mostrado promover el potencial metastásico en el cáncer de mama, el glioblastoma y en células de melanoma en ensayos de invasión de células *in vitro*. Se decidió evaluar si el anticuerpo monoclonal anti-S1P podría bloquear la migración celular mediada por S1P. Para evaluar los efectos quimiotácticos de S1P en las células tumorales, se utilizó un ensayo de invasión celular con Matrigel *in vitro* comúnmente utilizado en estudios de quimioinvasión. Como se muestra, el tratamiento con niveles de S1P que se encuentran en el suero humano indujo un incremento de la invasión en células A549, HT-29 y MCF-7 a través de la matriz de Matrigel. Se obtuvo un aumento de 6 a 9 veces en la migración celular se obtuvo con S1P 1  $\mu$ M en comparación con las células control no tratadas. La adición del anticuerpo monoclonal anti-S1P redujo la invasión de las células tumorales hasta los niveles de control. Cuatro experimentos de control demostraron la especificidad de estos efectos. En primer lugar, la incubación de células A549 con LPA no tuvo ningún efecto sobre la migración de las células, lo que demuestra el efecto específico de S1P en esta línea celular. En segundo lugar, la adición de IgG de ratón no-específica no inhibió la migración celular inducida por S1P. En tercer lugar, titulando la concentración de Acm anti-S1P mAb desde 1  $\mu$ g/ml hasta 0,001  $\mu$ g/ml redujo la capacidad del anticuerpo para neutralizar eficazmente la totalidad de la S1P. En cuarto lugar, las células B16-F10 (que se determinaron previamente que no respondían a S1P, véase el ejemplo 5) no migraron tras la incubación con S1P.

### Ejemplo 9

#### Demostración *in vitro* de que el Acm anti-S1P bloquea la angiogénesis

50 El proceso de neo-vascularización es vital para la supervivencia y el crecimiento de un tumor. La neo-vascularización depende de la invasión, formación de vasos y supervivencia de las células endoteliales dentro de o adyacentes al tumor en crecimiento. Esta serie de experimentos describe la evaluación de la capacidad de promoción tumoral de S1P para estimular la neo-vascularización en términos de formación de túbulos, la migración, y la supervivencia frente a los agentes quimioterapéuticos.

55 Se ha demostrado que S1P promueve la migración de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y la formación *de novo* de vasos sanguíneos *in vitro* utilizando Matrigel y otros ensayos similares. Las HUVEC aisladas

de cordones umbilicales humanos forman estructuras tubulares similares a capilares cuando se les proporciona factores de crecimiento importantes. Mientras que los anticuerpos dirigidos contra factores de crecimiento de proteínas clave como VEGF y FGF neutralizan la formación de vasos sanguíneos y el crecimiento del tumor, los efectos anti-angiogénicos de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra factores de crecimiento esfingolípidos no se han examinado anteriormente. Se ha demostrado que las HUVEC sembradas sobre Matrigel con factor de crecimiento reducido forman múltiples estructuras similares a capilares en la presencia de concentraciones en suero/plasma fisiológicamente relevantes de S1P (400-700 pmol/ml). Las HUVEC no lograron formar estructuras similares a capilares en ausencia de S1P. Por otra parte, un anticuerpo monoclonal dirigido contra S1P reduce sustancialmente la formación de las típicas estructuras similares a capilares.

La capacidad de las células endoteliales para migrar al sitio de un tumor también es un proceso importante durante la angiogénesis. Se ha determinado la capacidad de concentraciones fisiológicas de S1P para estimular la migración de HUVEC en el ensayo de quimioinvasión de Matrigel descrita anteriormente. Se ha demostrado la potente capacidad de S1P 0,1-1  $\mu$ M para estimular la migración de HUVEC 2-2,5 veces respecto a las HUVEC no tratadas. Es importante destacar que esta estimulación de la migración fue completamente neutralizada por la adición del anticuerpo monoclonal anti-S1P.

La capacidad de las células endoteliales para sufrir angiogénesis y alimentar un tumor en crecimiento depende también de la capacidad de las células para eludir la muerte celular inducida por agentes quimioterapéuticos. Se ha demostrado la capacidad de S1P para proteger potentemente HUVEC de la muerte celular, como se observó en el ensayo de la activación de la caspasa-3. La capacidad de S1P para proteger a las células de la muerte se invirtió mediante incubación con el Acm anti-S1P. Por otra parte, de modo similar a los ensayos descritos anteriormente, el Acm anti-S1P aumentaba la activación de la caspasa-3 inducida por doxorubicina y paclitaxel. Estos experimentos se realizaron en presencia de 20% de suero, lo que demuestra la capacidad de la S1P endógena en suero para proteger a las HUVEC de la muerte celular inducida por agentes quimioterapéuticos.

Estos estudios confirman que S1P es un potente factor de crecimiento pro-angiogénico que puede influir en el crecimiento *de novo* de vasos sanguíneos y proteger a las células endoteliales vasculares de los agentes citotóxicos. Estos resultados demuestran que un agente anti-S1P puede ejercer un efecto anti-angiogénico por varios mecanismos, incluyendo uno que aumenta la muerte celular inducida por quimioterapia de las células endoteliales. Por otra parte, dichos agentes, en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar, pueden actuar para reducir la angiogénesis y enlentecer la progresión del cáncer en la práctica clínica. En suma, estos resultados demuestran que S1P es un factor de crecimiento tumorigénico pleiotrópico que tiene profundos efectos en la proliferación de células tumorales, la invasión (es decir, potencial metastásico), la neo-vascularización y la protección de la apoptosis. Además, S1P protege a la mayoría de los tipos de células contra los quimioterapéuticos apoptóticos. A pesar de que la proliferación celular estaba significativamente estimulada por S1P, los efectos de S1P sobre los otros parámetros eran mucho más dramáticos y eran uniformemente aplicables a la mayoría de los tipos de células estudiadas. Los efectos pro-angiogénicos de S1P fueron dramáticos y los agentes anti-S1P, tales como el anticuerpo monoclonal anti-S1P descritos en la presente memoria, bloquean todos estos efectos. Además, los resultados demuestran que los agentes tales como el anticuerpo monoclonal anti-S1P pueden bloquear la producción de otros factores de crecimiento pro-angiogénicos, proporcionando un mecanismo terapéutico adicional para nuestro Acm anti-S1P en la detención de la progresión del tumor.

Se ha demostrado la eficacia de un agente anti-S1P para bloquear la micro-vascularización de los tumores, así como la inhibición del crecimiento celular tumoral (volumen y peso). Datos convincentes de cribado de varias líneas celulares derivadas de una variedad de tipos de tumores sólidos y circulantes muestran que los agentes anti-S1P (por ejemplo, anticuerpos) pueden ser útiles en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, en particular los que tienen una dependencia de la angiogénesis. Los perfiles farmacocinético y de toxicología *in vivo* favorables de los agentes, tales como el anticuerpo monoclonal anti-S1P descritos en la presente memoria demuestran además, que es probable que los agentes anti-S1P puedan convertirse en fármacos para el tratamiento en seres humanos.

### **Ejemplo 10**

#### El Acm anti-S1P bloquea la angiogénesis tumoral en un modelo de aloinjerto *in vivo*

Los tumores en crecimiento dependen del crecimiento de vasos sanguíneos. Los agentes que pueden inhibir este proceso sin una toxicidad significativa podrían servir como nuevas terapias anti-tumorales potentes. Aunque el anticuerpo terapéutico anti-VEGF, Avastin, fue aprobado recientemente para uso clínico para el tratamiento del cáncer de colon, Avastin no ha probado ser eficaz en los ensayos clínicos de cáncer de pulmón y cáncer de mama. Por lo tanto, aún se necesitan enfoques adicionales para inhibir la angiogénesis tumoral. Como se muestra en el Ejemplo 9, uno de estos enfoques es bloquear los efectos pro-angiogénicos de S1P. El Acm anti-S1P se ha demostrado que inhibe potentemente la migración de células endoteliales inducida por S1P, el crecimiento capilar y la supervivencia celular *in vitro*. También se ha demostrado que el Acm anti-S1P neutraliza la capacidad de S1P para mejorar de formación de vasos sanguíneos *de novo* en el modelo de angiogénesis del tapón de Matrigel murino *in vivo*. En consecuencia, se investigó la eficacia de anti-S1P para reducir la microvascularización de los tumores en dos modelos murinos *in vivo*. Como S1P ha mostrado promover o aumentar la angiogénesis, se esperaba que el Acm anti-S1P inhibiese *de novo* la formación de vasos sanguíneos e impidiese el crecimiento del tumor.

En base a los estudios *in vitro* descritos en los ejemplos 5 y 8, se sabía que la línea celular derivada de tumor de melanoma murino B16-F10 no respondía a los efectos directos de la S1P. S1P no indujo proliferación, invasión ni protección de la muerte celular en estas células, como lo hace en la mayoría de las otras células tumorales. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que cualquier efecto anti-tumoral del Acm anti-S1P en tumores B16-F10 que surgiese no sería por la inhibición del crecimiento tumoral inducida por S1P, sino por una inhibición del aumento la angiogénesis asociada a tumores. Por lo tanto, una inhibición de la neo-vascularización en el tumor en crecimiento ralentizaría significativamente la progresión del tumor. Por lo tanto, se realizó un estudio para investigar la capacidad del Acm anti-S1P para retardar el crecimiento del tumor de melanoma después de la implantación de un xenoinjerto ortotópico de las células B16-F10 en ratones.

En este modelo, los tumores se desarrollaron en ratones C57B1/J6 hembra de 4 semanas de edad (la cepa de la que las células de melanoma se aislaron originalmente) por implantación de células B16-F10 en los flancos derechos de los ratones. Se dejó que los tumores se establecieran hasta un volumen de 100 mm<sup>3</sup>, según se determinó mediante mediciones con calibre. Cuando los tumores comenzaron a alcanzar los volúmenes deseados, los ratones fueron asignados al azar a grupos de tratamiento (n = 6-8). Los ratones con tumores entre 75-150 mm<sup>3</sup> fueron seleccionados para el tratamiento. Todos los animales que contenían los tumores fuera de este intervalo de volumen no se incluyeron en este estudio. Los ratones seleccionados fueron inyectados por vía ip cada tres días, ya sea con el Acm anti-S1P (25 mg/kg), un Acm emparejado no específico (25 mg/kg; dirigido contra un patógeno de las plantas) o solución salina. Todos los tratamientos fueron doble ciego. Dos personas midieron de forma independiente todos los días los volúmenes de los tumores y se promediaron. Cuando los volúmenes tumorales comenzaron a alcanzar el tamaño máximo (alrededor de 1,8 cm<sup>3</sup> según los estándares IACUC), se sacrificó a todos los animales. Se registraron los volúmenes de los tumores y los pesos finales. Hasta que no se analizaron todos los datos, no se desenmascaró el estudio.

Se ha demostrado una reducción del 60% del volumen del tumor con el tiempo a partir de ratones tratados con el Acm anti-S1P en comparación con los animales tratados con solución salina o el Acm no específico. Se ha confirmado la inhibición de la progresión del tumor producida por la reducción de la neovascularización del tumor. Se cree que la reducción de la progresión del tumor está directamente relacionada con los efectos anti-angiogénicos del Acm anti-S1P. Además, estos ratones no estaban inmunocomprometidos, lo que indica que el bloqueo de la acción de esfingolípidos puede reducir la progresión del tumor en los animales normales. Además, este estudio demuestra que los tumores derivados de ratón pueden ser tratados con un anticuerpo anti-S1P, lo que indica que el anticuerpo también será útil para aplicaciones veterinarias destinadas al tratamiento contra el cáncer, particularmente en animales de compañía y ganado.

### **Ejemplo 11**

#### El Acm anti-S1P en combinación con agentes quimioterapéuticos reduce la progresión del tumor

Mientras que el Ejemplo 1 demuestra que un Acm anti-S1P es eficaz en reducir el tamaño del tumor cuando se administra solo, el tratamiento de los cánceres humanos puede tener más éxito o se puede aplicar para tratar más tipos de cáncer, si se administra un agente que se une y reduce la concentración eficaz *in vivo* de S1P en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o como un complemento a los procedimientos como la cirugía y la radioterapia. En efecto, cuando los ratones que tienen tumores bastante grandes (por ejemplo, 700-800 mm<sup>3</sup>; establecidos mediante el implante de células de carcinoma mamario MDA MB 231) eran tratados con el Acm anti-S1P (25 mg/kg cada dos días) solo o en combinación con una dosis de Taxol (paclitaxel) en una dosis en bolo de 20 mg/kg, la combinación demostró un efecto sinérgico en el sentido de que los ratones tratados con anticuerpos apenas mostraban crecimiento adicional. Por otra parte, la adición del agente de unión a S1P para el tratamiento quimioterapéutico mejoraba drásticamente la supervivencia de los ratones.

### **Ejemplo 12**

#### El Acm anti-S1P administrado solo elimina los tumores de ovario humano establecidos

Mientras que los Ejemplos 1 y 12 demuestran que un Acm anti-S1P es eficaz en reducir el tamaño del tumor cuando se administra solo o en combinación con agentes citotóxicos, este ejemplo demuestra que, utilizando el tipo de tumor humano adecuado, se puede demostrar la eliminación de tumores establecidos, es decir, se puede conseguir la curación.

Se ha demostrado que el Acm anti-S1P era eficaz en eliminar tumores de ovario humano SKOV3 ortotópicos establecidos en ratones desnudos. En este modelo, se dejó a los tumores establecerse durante dos semanas antes de la iniciación del tratamiento. El análisis de RM reveló que todos los ratones del grupo control con solución salina contenían tumores grandes en toda la cavidad peritoneal y que estos ratones habían acumulado cantidades observables de fluido de ascitis. Por el contrario, en tres de los cinco animales tratados con el Acm anti-S1P a 25 mg/kg ip cada tres días, no se detectaron tumores ni ascitis durante el análisis de RM ni tras la disección de la cavidad peritoneal después de la terminación. Sólo dos de los cinco animales tratados con el Acm anti-S1P tenían tumores detectables; significativamente, estos tumores eran 68% más pequeños (750 mg frente a 2300 mg) que los tumores de los animales tratados con solución salina (\*p<0,05). Además, los animales tratados con el Acm anti-S1P

y sin tumores tenían una gran cantidad de grasa subcutánea alrededor de sus estómagos, lo que confirma los pesos corporales normales y sobre todo la salud que presentaban los animales tratados con anticuerpos.

### Ejemplo 13

#### Angiogénesis y degeneración macular asociada a la edad

5 El objeto de los experimentos descritos en este ejemplo era determinar si un Acm anti-S1P podría reducir la angiogénesis en un modelo distinto al de la angiogénesis tumoral. Para estos estudios se utilizó un modelo animal establecido de degeneración macular asociada con la edad (DMAE), concretamente, la neovascularización coroidea (NVC) por rotura de la membrana de Bruch con quemaduras de láser utilizando una lámpara de hendidura.

10 El deterioro de la visión en la DMAE es una consecuencia tanto de cicatrización (es decir, la fibrosis, la fibrogénesis) como de la neovascularización. Debido a que S1P es pro-angiogénico, se razonó que el Acm anti-S1P usado en los experimentos descritos en los ejemplos anteriores podría inhibir la angiogénesis mediante la reducción de la supervivencia, la migración y la proliferación de las células endoteliales (CE); inhibiría la formación de cicatrices reduciendo la supervivencia, migración y la proliferación de los fibroblastos; e inhibiría la comunicación entre S1P con compuestos pro-angiogénicos, incluyendo VEGF, bFGF, interleucinas y factores de crecimiento que contribuyen a la vascularización no controlada durante la DMAE. Por lo tanto, la proliferación descontrolada de las células, como las CE en la DMAE podría considerarse un trastorno de las células hiperproliferativas.

15 En este caso, los tratamientos consistieron en inyecciones intravítreas (IVR) de Acm anti-S1P o de un Acm de ratón no específico emparejado por isotipo. Las inyecciones IVR consistieron en 0,5 µg del Acm anti-S1P diluido en 2 µl o en un volumen igual de vehículo. Las inyecciones IVR se administraron cada 7 días comenzando 1 día antes de la quemadura láser y se prolongaron durante toda la duración del estudio. Justo antes de las inyecciones IVR, los ratones fueron anestesiados con ketamina/xileno administrado por vía IP. Bajo anestesia los ojos del animal se hidrataron frecuentemente con solución salina normal. Las inyecciones IVR se realizaron lentamente en el ojo derecho de cada animal con una aguja de calibre 32. Para todas las inyecciones IVR, los ojos se cubrieron con antibióticos estándar hidratantes que contenían vaselina. Las pupilas de los ratones se dilataron con fenilefrina/atropina durante 10 minutos y luego se anestesiaron con ketamina/xileno (5:1) durante 5 minutos antes de la inducción de las quemaduras láser. Se colocó una lámina cubreobjetos sobre la superficie del ojo (lado inferior) con un medio oftalmológico transparente para actuar como una lente para el láser. Se iluminó una luz en el ojo para visualizar el nervio óptico y la retina neural. A continuación se enfocó un láser fino sobre la parte posterior de la retina y se dirigió perpendicular a la parte posterior del ojo. Se hicieron tres quemaduras a 1 disco óptico (tamaño del nervio óptico) de distancia desde el nervio óptico entre los vasos sanguíneos (evitando los vasos sanguíneos). Los ajustes para el láser fueron los siguientes: duración de 100 ms, intensidad de 250 mW y un diámetro de 50 micrómetros. Las quemaduras láser viajaron a través de la retina neural y se dirigieron a la pigmentación de la capa de EPR, causando una ruptura de la membrana de Bruch. Inmediatamente después de la quemadura, se formó una bolsa de líquido alrededor de la quemadura y marcó el lugar de la quemadura. La bolsa se formó como consecuencia de la expansión del líquido debido al calor de la quemadura. La bolsa finalmente disminuyó, pero aún se podía observar una pequeña mancha de quemadura. Los animales se observaron hasta que se recuperaron de la anestesia.

20 Dos semanas después de la rotura de la membrana de Bruch, los animales se sacrificaron y se recogieron sus ojos y se colocaron en paraformaldehído durante la noche. Los ojos se lavaron en PBS y se aisló el complejo EPR-coroides-esclerótica de la retina neural. Los complejos (~ 200 micrómetros de espesor) se incubaron a continuación en PBS que contenía Triton X-100 y un anticuerpo anti-glutanin-rodamina durante la noche. Después, el complejo se lavó y se montó para su evaluación. Utilizando la proyección de imagen de línea Z con microscopía confocal, se obtuvieron secciones de 4 micrómetros desde la parte superior hasta la parte inferior del complejo (~ 50 imágenes). El área con cicatriz/vascularizada central (- medio del complejo) se describió de forma manual y las imágenes se analizaron independientemente para los niveles de fondo de fluorescencia. La fluorescencia de fondo se restó del área contorneada de cada imagen y la continuación cada área se analizó para determinar la fluorescencia relativa. Luego se calculó la fluorescencia total. Cada animal, con las 3 quemaduras, era una n de 1.

25 El Acm anti-S1P redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) la formación de lesión de NVC (~ 50% de reducción) cuando se administraba mediante inyección IVR, en comparación con la inyección IVR de un anticuerpo monoclonal no específico emparejado por isotipo.

### Ejemplo 14

#### Fibrogénesis

30 Los trastornos hiperproliferativos que implican fibroblastos (es decir, fibrogénesis) incluyen, pero sin limitación, trastornos de cicatrización excesiva (es decir, fibrosis), tales como la degeneración macular asociada con la edad (DMAE), remodelación cardíaca e insuficiencia asociada con infarto de miocardio, cicatrización de heridas excesiva, como se produce normalmente como consecuencia de cirugía o lesión, queloides y tumores fibroides. Este Ejemplo 14 demuestra que S1P es un potente activador de la proliferación de fibroblastos, la migración y la expresión de genes de colágeno in vitro e in vivo y que un Acm anti-S1P es eficaz en reducir los efectos mediados por S1P sobre

la actividad de los fibroblastos. Además, el anticuerpo demostró mitigar la formación de cicatrices en un modelo cardiaco.

5 El estudio *in vitro* con fibroblastos cultivados demostró la potente capacidad de S1P para activar la proliferación de fibroblastos, la migración y la expresión de genes de colágeno. En estos experimentos, el Acm anti-S1P mitigaba los efectos mediados por S1P y daba lugar a una disminución de la actividad de los fibroblastos.

10 Con el fin de demostrar los efectos beneficiosos de la reducción de la formación de cicatrices mediada por fibroblastos, se desarrolló un modelo *in vivo* de insuficiencia cardíaca realizando a los ratones ligaduras coronarias permanentes durante la toracotomía, seguido de tomas de dos semanas. En estos estudios, el Acm anti-S1P (25 mg/kg) se administró por vía ip 48 h después de los infartos, seguido de la administración cada tres días hasta la terminación del estudio. Se eligió el tiempo de 48 horas después de la inducción del infarto porque se pensó que cierta formación de cicatriz sería beneficiosa durante este período y que los efectos angiogénicos de S1P también se manifestarían inmediatamente después de los infartos, pero no necesariamente a partir de entonces. Además, se razonó que la formación excesiva de cicatrices sería contraproducente después del período de 48 h debido a la profunda fibrosis mal adaptada que comúnmente resulta del proceso de remodelación. El aumento de la capacidad de supervivencia de los ratones infartados que fueron tratados con el Acm anti-S1P demuestra que la mitigación de la fibrosis cardiaca mal adaptada puede tener como resultado una mejoría de la supervivencia.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal que se une a la esfingosina-1-fosfato (S-1-P) e inhibe la actividad de S1P para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno hiperproliferativo asociado a S-1-P en un mamífero, en el que el trastorno hiperproliferativo asociado a S-1-P está seleccionado del grupo que consiste en una neoplasia, angiogénesis tumoral, degeneración macular asociada con la edad, insuficiencia cardíaca, inflamación y cicatrización.
2. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 1, en el que la neoplasia es un cáncer.
3. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 2, en el que el cáncer es un tumor sólido o un tumor hematológico.
4. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 1, en el que el mamífero está seleccionado de entre el grupo que consiste en animales bovinos, caninos, equinos, ovinos y porcinos.
5. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano.
6. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal está contenido en una composición que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es administrado como monoterapia.
8. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es administrado como parte de una terapia de combinación.
9. El anticuerpo monoclonal para su uso según la reivindicación 8, en el que la terapia de combinación, además de la administración del anticuerpo, comprende además la administración de un segundo régimen terapéutico seleccionado del grupo que consiste en la administración de un agente quimioterapéutico, radioterapia, cirugía y una combinación de cualquiera de los anteriores.