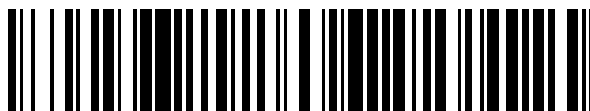


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 565**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2009** **E 09775114 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013** **EP 2368118**

54 Título: **Biomarcadores para inhibidores con actividad anti-angiogénica**

30 Prioridad:

23.12.2008 EP 08022436

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

29.01.2014

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

BEHRENS, JOYCE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 440 565 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

Biomarcadores para inhibidores con actividad anti-angiogénica

Área de la invención

La presente invención hace referencia a un método para la evaluación del efecto de inhibidores de la integrina sobre la angiogénesis mediante el uso de determinados biomarcadores identificados. Este método es particularmente beneficioso para la determinación de la eficacia de los inhibidores de la integrina utilizados principalmente para el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis tales como el cáncer. En especial, la presente invención hace referencia a biomarcadores ligados a la angiogénesis, a los que se accede preferiblemente en los fluidos corporales y por lo tanto permiten el análisis de la modulación diana de forma no invasiva. También se revela el uso de dichos biomarcadores para el cribado de compuestos con actividad inhibidora de la integrina, preferiblemente el anticuerpo DI-17E6 y el péptido cilengitide de RGD.

Antecedentes de la invención

La angiogénesis se aplica generalmente a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. La proliferación de células endoteliales que experimentan la síntesis de ADN es una señal de brotes vasculares microvasculares, mientras que los brotes extensivos requieren principalmente la migración de células endoteliales. La angiogénesis es un proceso fundamental que es orquestado por una variedad de factores angiogénicos e inhibidores. Los activadores de la proliferación de células endoteliales y la migración son principalmente ligandos receptores tirosina quinasa, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero puede también ser de un origen muy diferente, tal como un origen lisofosfático (LPA) (Bergers et al. (2003) Nature Reviews 3, p. 401- 410). El EGF aumenta de manera regulada el VEGF, FGF la interleucina-8 (IL-8), mientras que el LPA aumenta de manera regulada los niveles de VEGF. El primer inhibidor angiogénico descrito fue la trombospondina- 1, que modula la proliferación y movilidad celular. De manera extraordinaria, muchas moléculas inhibitoras, tales como las estatinas, se derivan de proteínas de mayor tamaño que no ejercen efecto alguno en la angiogénesis; por ejemplo, la angioestatina, un fragmento de plasminógeno que se une a la ATP sintasa y anexina III además de endostatina, tumstatina y canstatina (fragmentos de colágenos que se unen a integrinas). En general, los niveles de activadores e inhibidores indican si una célula endotelial estará en un estado quiescente o angiogénico. Se cree que los cambios en el equilibrio angiogénico actúan como mediadores en la activación de la angiogénesis.

Su papel fisiológico se enmarca en el desarrollo, reproducción y reparación de células, tejidos y órganos. La angiogénesis patológica es necesaria para que los tumores y sus metástasis crezcan más allá de un tamaño microscópico, y puede dar lugar a sangrado, derrame vascular y destrucción de tejidos. Las consecuencias de la angiogénesis patológica pueden ser responsables, directa o indirectamente, de los síntomas, incapacitación o muerte asociada a un amplio rango de enfermedades asociadas a la angiogénesis. Ejemplos de tales enfermedades incluyen trastornos tumorales, enfermedades autoinmunes, degeneración macular y aterosclerosis entre otras.

En referencia a la progresión tumoral, la activación de la angiogénesis puede ocurrir en diferentes etapas de la vía de progresión tumoral, dependiendo del tipo de tumor y el entorno. Sin embargo, la neovascularización es habitualmente un requisito previo de la progresión tumoral.

Varias vías de señalización están implicadas en el proceso de la angiogénesis. El VEGF juega un papel central en la vasculogénesis y la angiogénesis; de todos los factores angiogénicos, el VEGF es el factor más frecuentemente asociado con la progresión tumoral y la metástasis. La evidencia preliminar sugiere que la sobreexpresión de varias isoformas puede tener efectos diferenciales sobre los tumores.

Las etapas clave en la angiogénesis asociada a tumores incluye la secreción de VEGF por parte de células tumorales que se unen a su receptor VEGFR2 y a la neuropilina en las células endoteliales (Folkman 2007, Nature Reviews, 6, p. 273-286). Es el más común de los al menos seis diferentes factores angiogénicos de los tumores. Las metaloproteasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés) se liberan a de células tumorales, pero también mediante células estimuladas por VEGF. Las MMPs movilizan las proteínas pro-angiogénicas del estroma, pero también dividen el inhibidor angiogénico endostatina del colágeno 18 en la pared vesicular y participa en el corte del inhibidor angiogénico angiostatina del plasminógeno circulante. Las células tumorales secretan angiopoyetina 2 (ANGPT2) que compete con la ANGPT1 para unirse al receptor endotelial TIE2. La angiopoyetina 1 (ANGPT1), expresada por muchas células, se une al receptor endotelial TIE2 (también conocido como TEK), y ayuda a mantener un estado normalizado en el vaso sanguíneo. La ANGPT2 aumenta la degradación de la membrana basal vascular y la migración de las células endoteliales, facilitando por lo tanto la formación de brotes. El PDGF, secretado por muchos tumores, puede aumentar su propio receptor (PDGFR) en las células endoteliales. El factor de crecimiento de los fibroblastos básicos (bFGF) es secretado por otros tumores. En respuesta a los reguladores

del crecimiento tales como el VEGF y el bFGF, las células endoteliales producen un aumento regulado de ciertas integrinas. Las integrinas son moléculas de adhesión a la superficie celular que facilitan la unión endotelial a un entorno extracelular, un requerimiento para que las células mantengan la viabilidad y la reactividad a las proteínas reguladoras del crecimiento. Las células endoteliales son las células más dependientes del anclaje. Las integrinas están pensadas para mantener la viabilidad de la célula endotelial durante los desprendimientos intermitentes de células endoteliales que se requieren para migrar hacia un tumor y para aumentar su sensibilidad a los reguladores del crecimiento, tales como el VEGF y el bFGF.

Las integrinas juegan un papel en la angiogénesis tumoral y la metástasis, y otras diversas enfermedades en humanos dependientes de la angiogénesis como la psoriasis y la artritis reumatoide ((Mousa SA, *Drugs of the Future* 1998; 23 (1) :51- 60). Son moléculas de adhesión a la superficie celular que acoplan el entorno extracelular al citoesqueleto (Geiger B. et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 793- 805). Además de sus funciones estructurales, son receptores para la transmisión de señales importantes para la adhesión, migración, proliferación y supervivencia celular.

Los eventos de señalización inducida por integrinas son múltiples y dependen del contexto celular. La unión de ligandos al dominio de la integrina extracelular induce cambios conformacionales y al agrupamiento de integrinas lo que conduce a la activación de las cascadas de señalización y reclutamiento de complejos multi-proteínas a adhesiones focales (Geiger B. et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 793- 805). Los mensajes se transmiten a través de una variedad de proteínas quinasas intracelulares y moléculas adaptadoras que incluyen Ras, MAP quinasa (MAPK), quinasa de adhesión focal (FAK), Src, Rac/Rho/cdc42 GTPasas, PKC y PI3K. A través de estas moléculas, la señalización de integrinas interactúa de forma cooperativa y cercana con la señalización del receptor tirosina quinasa para regular la supervivencia, proliferación, adhesión y migración (Giancotti FG. et al., *Science* 1999; 285 (5430) : 1028- 32).

Las integrinas forman heterodímeros que consisten en dos subunidades, alfa y beta (Hynes RO. *Trends Cell Biol* 1999; 12: 33- 37). Se expresan de forma diferenciadora en diversos tipos de células y reconocen múltiples ligandos de las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, vitronectina, fibronectina y laminina. Un subconjunto de integrinas que incluyen alfa (V) beta (3) y alfa (V) beta (5), reconoce un motivo común en sus ligandos, la secuencia RGD, que está presente en ligandos tales como vitronectina, fibronectina, fibrinógeno (Ruoslahti E. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996. 12:697- 715).

La integrina $\alpha v \beta 5$ se une específicamente a la vitronectina, mientras que la $\alpha v \beta 3$ también se une a otras macromoléculas del ECM provisional. La $\alpha v \beta 3$ se une por ejemplo a ligandos que incluyen fibrina, fibrinógeno, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de von Willebrand, osteospondina y sialoproteína ósea I. El papel que juega la adhesión celular específica de estas integrinas en las diversas interacciones celulares en los tejidos está aún bajo investigación, pero es claro que hay diferentes integrinas con diferentes funciones biológicas.

La $\alpha v \beta 3$ se expresa de forma elevada en células endoteliales activadas, tales como células endoteliales tumorales, pero no en células endoteliales en reposo y la mayoría de los sistemas de órganos normales, lo que la convierte en una diana adecuada para la terapia anti-angiogénica (Brooks PC et al., *Science* 1994; 264:569-71). La $\alpha v \beta 3$ se observó por primera vez en el cáncer como un marcador dependiente de la progresión del melanoma maligno. Aumentaba el crecimiento del melanoma in vivo y su supervivencia in vitro. Los bloqueantes de la $\alpha v \beta 3$ revertían estos efectos. Posteriormente, la $\alpha v \beta 3$ se observó en otros tumores que incluyen glioblastoma, carcinomas renales, carcinomas de ovarios y otros. La $\alpha v \beta 3$ se sobreexpresó también ampliamente en las CE en muchas malignidades. In vitro, los modelos angiogénicos activados por factores de crecimiento derivados de tumores se sobreexpresaron y necesitaron la $\alpha v \beta 3$ en la vasculatura que iba brotando, mientras que el bloqueo de $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ pudo suprimir el fenotipo angiogénico. También se mostró que la $\alpha v \beta 5$ respaldaba la neovascularización inducida por algunos factores de crecimiento derivados de tumores. La inhibición de $\alpha v \beta 5$ puede activar/disparar la apoptosis de células tumorales.

Se ha sugerido a los inhibidores de la integrina como un principio farmacéuticamente activo en la medicina humana y veterinaria, en particular para la profilaxis y el tratamiento de principalmente trastornos asociados a la angiogénesis. Pueden utilizarse para el tratamiento y la profilaxis de trastornos del sistema circulatorio, trombosis, infarto cardíaco, arteriosclerosis, inflamaciones, apoplejía, angina de pecho, trastornos tumorales, trastornos osteolíticos, especialmente osteoporosis, angiogénesis y trastornos que son el resultado de la angiogénesis, por ejemplo retinopatía diabética del ojo, degeneración macular, miopía, histoplasmosis ocular, artritis reumatoide, osteoartritis, glaucoma rubeotico, y también colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiples, soriasis y restenosis tras angioplastia.

Existen diversos inhibidores de la integrina en el desarrollo clínico para el tratamiento del cáncer, artritis y soriasis, tal como cilengitide, abegrina (vitaxin, MEDI-522), CNT095, DI-17E6 y volociximab (Nemeth JA et al., *Cancer Invest.* 2007; 25(7): 632-646). Antagonizan la interacción de la integrina con la matriz extracelular (ECM), y perturba la función de las células tumorales y endoteliales. Dichos inhibidores de la integrina están caracterizados por distintas especificidades y mecanismos de acciones. La abegrina, volociximab, DI-17E6 y CNT095 son anticuerpos monoclonales antagonistas.

El cilengitide es un péptido cíclico antagonista (cyclo-(Arg- Gly- Asp- DPhe- NMeVal)) que imita el motivo RGD- (EP 0770622). El ciliengitide se dirige a las integrinas α , en particular $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$.

La patente US6521593 revela métodos para la inhibición del crecimiento tumoral en el cerebro, utilizando cilengitide como inhibidor de las integrinas $\alpha v\beta 3$ / $\alpha v\beta 5$. La invención incluye que dicho inhibidor de integrinas muestra un efecto anti- tumorgénico que depende de la anti- angiogénesis. De manera adicional, dicho antagonismo de la integrina puede inducir la muerte directa de células tumorales, que es independiente de la anti- angiogénesis. La patente WO02/41910 hace referencia al uso de cilengitide como inhibidor de la integrina $\alpha v\beta 3$ / $\alpha v\beta 5$ para el tratamiento de enfermedades del ojo de un paciente que son el resultado de la angiogénesis.

El anticuerpo monoclonal de ratón 17E6 inhibe de manera específica la subunidad de integrina αv - del receptor de la integrina humana que porta células. El anticuerpo IgG1 de ratón se describe, por ejemplo, en Mitjans et al. (1995; J.Cell Sci. 108, 2825) y en las patentes US 5.985.278 y EP 719 859. El 17E6 murino fue generado a partir de ratones inmunizados con $\alpha v\beta 3$ humana purificada e inmovilizada con sefarsa. Se fusionaron linfocitos del bazo de ratones inmunizados con células de mieloma murino, y uno de los clones de hibridomas resultantes produjo el anticuerpo monoclonal 17E6. El DI- 17E6 (CAS No: 1105038- 73- 0) es un anticuerpo que presenta las características biológicas del anticuerpo monoclonal de ratón 17E6, pero con propiedades mejoradas sobre todo con respecto a la inmunogenicidad en humanos. La secuencia de aminoácidos constante y variable completa de este anticuerpo modificado se presenta en la Figura 1 y en la WO 2009/010290.

La terapia anti- angiogénica fija como diana las células endoteliales vasculares activadas, por ejemplo en un tumor. Puede lograr esto directamente evitando que las células endoteliales respondan al entorno a través de la inhibición de integrinas tal como se ha descrito anteriormente. Las terapias anti- angiogénicas pueden además actuar mediante neutralización de los factores angiogénicos, al igual que hace el bevacizumab (ver más adelante).

Sathornsumetee et al. (Current Pharm. Design 2007 (13), 3545) describe terapias en el glioma maligno con inhibidores angiogénicos, preferiblemente el anticuerpo bevacizumab anti-VEGF en combinación con otros agentes.

La patente WO 2007/022412 muestra que fijando como diana el HIF-1 y simultáneamente una segunda diana angiogénica, tal como IL-8 o VEGF, puede inhibirse la angiogénesis del tejido tumoral.

La patente WO 2006/022895 revela un método de ex-vivo para evaluar el estado angiogénico, por ejemplo en conexión con el cáncer, midiendo la cantidad de biomarcadores específicos, tales como VEGF, PDGF o IL-8, en una muestra biológica de un sujeto humano. Sin embargo, este documento no se pronuncia respecto al efecto y eficacia de los fármacos para el cáncer anti- angiogénicos específicos, en el contexto de la existencia cuantitativa y cualitativa de dichos biomarcadores angiogénicos en dependencia de dichos fármacos.

Las variaciones genéticas de por ejemplo factores angiogénicos tienen importantes consecuencias para el tratamiento clínico de las enfermedades asociadas a la angiogénesis. Por ejemplo, los individuos con síndrome de Down tienen un nivel de endostatina 1,6 veces más elevado que un individuo normal debido a una copia extra del gen precursor de endostatina. Ellos parecen ser los más protegidos contra el cáncer de todos los humanos. Por lo tanto, las diferencias en la angiogénesis debido a las variaciones genéticas deberían considerarse en las terapias anti- angiogénicas.

La terapia angiogénica podría requerir de manera óptima que las células endoteliales se expongan a niveles en sangre en estado de estabilidad de los inhibidores. Por lo tanto, una dosificación frecuente sería óptima para los inhibidores polipeptídicos cíclicos tales como el cilengitide. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales tales como el D7E16 podrían administrarse a intervalos mayores debido a que son anticuerpos de mayor duración.

Los tumores podrían volverse refractarios/resistentes a la terapia anti- angiogénica, en especial si una terapia mono- anti- angiogénica fija como diana sólo una proteína angiogénica (por ejemplo el VEGF). Con la terapia anti- VEGF-, tal como un anticuerpo para el VEGF (bevacizumab), la vasculatura de los tumores de etapa temprana disminuye y el crecimiento tumoral es limitado. Sin embargo, en análisis retrospectivos un tratamiento anti- angiogénico continuado de tumores metastásicos con bevacizumab no dio resultados beneficiosos. Aunque el VEGF es expresado por hasta un 60% de tumores en humanos, la mayoría de los tumores pueden también expresar de cinco a ocho proteínas angiogénicas. Cuando la expresión se suprime durante un largo periodo de tiempo la expresión de otra proteína angiogénica puede presentarse (Dorrell et al (2007) Proc. Natl. Acad. Sci doi: 10.1073/ pnas. 0607542104).

Por lo tanto, por las razones descritas anteriormente un panel de biomarcadores específicos y sensibles que esclarecen vías de señales enlazadas podría ayudar en la elección de terapias anti- angiogénicas. Además, podrían apoyar el diagnóstico de un tumor recurrente microscópico incluso antes de que pueda ser localizado anatómicamente.

Además, los tumores poco vascularizados serán inhibidos mediante una dosis significativamente inferior de un inhibidor de la angiogénesis de la que se necesita para un tumor altamente vascularizado. Estos tumores podrían expresar sus propios inhibidores de la angiogénesis y podrían responder a una dosis inferior de un inhibidor de la angiogénesis.

- 5 Las variaciones genéticas y procesos diversos angiogénicos, por ejemplo el amplio rango de tipos de tumores y su desarrollo requieren entre otras cosas un amplio panel de biomarcadores informativos para optimizar e individualizar una terapia angiogénica.

10 Podría ser posible utilizar biomarcadores basados en la angiogénesis para monitorizar la progresión o regresión de ciertas enfermedades dependientes de la angiogénesis que son no neoplásicas. Estas incluyen por ejemplo aterosclerosis, endometriosis, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide entre otras.

Resumen de la invención

La presente invención basa en las diferentes experiencias que la terapéutica anti- angiogénica requiere biomarcadores moleculares informativos (Bertolini F et al. Drug Discov Today. 2007; 12 (19- 20) : 806- 12). Dichos biomarcadores podrían utilizarse preferiblemente por ejemplo

- 15 (1) para la medición del estado de la diana molecular y los parámetros farmacodinámicos (PD) de los efectos de un fármaco en la diana,
- (2) para la identificación de vías de señales enlazadas de la angiogénesis
- (3) para encontrar los fármacos anti- angiogénicos más adecuados para pacientes individuales
- (4) para proporcionar una prueba del concepto para la modulación de dianas
- 20 (5) para probar la hipótesis subyacente
- (6) para proporcionar selección racional de dosis y esquema de terapia anti- angiogénica
- (7) para explicar o predecir los resultados clínicos.

25 A pesar de los muchos éxitos de la terapia molecular contra el cáncer, tal como el trastuzumab e imatinib, sólo unos pocos fármacos oncológicos que se incorporan a la fase clínica consiguen la aprobación para su comercialización. El uso de biomarcadores moleculares debería reducir este elevado nivel de desgaste, reduciendo costes, de ese modo, el coste del desarrollo de fármacos e incrementando la probabilidad de obtener fármacos innovadores y activos a los pacientes con cáncer.

30 Estos biomarcadores moleculares podrían complementar la información que viene dada por biomarcadores celulares. Biomarcadores celulares son, por ejemplo, diferentes poblaciones de células endoteliales tales como las células endoteliales circulantes y progenitores de células endoteliales circulantes que se utilizan como marcadores para la angiogénesis. El marcador biomolecular podría compensar las desventajas de los biomarcadores celulares tales como los conteos subjetivos de las poblaciones de células endoteliales. El uso de dichos biomarcadores celulares requiere mucho más trabajo en la caracterización de células endoteliales relacionadas con el cáncer (Bertolini et al (2007) Drug discovery today 12, 806-812). También en técnicas de imagen tales como imágenes por resonancia magnética de contraste dinámico (DCE-MRI), por sus siglas en inglés) como una aproximación para la medición de la angiogénesis tiene algunas fuertes limitaciones para una aplicación rutinaria. Estas técnicas son caras y están restringidas a centros con la instrumentación adecuada.

40 La presente invención hace referencia a métodos para evaluar el efecto, la eficacia, seguridad, pronóstico, y / o dosificación de los agentes terapéuticos o fármacos que son inhibidores de la angiogénesis, preferiblemente inhibidores de la integrina o inhibidores multiquinasa dirigidos al sitio ATP de moléculas pequeñas para el tratamiento de pacientes que sufren de enfermedades relacionadas con la angiogénesis, de manera preferible cáncer.

45 La presente invención se relaciona además con métodos de evaluación del efecto de inhibidores de la angiogénesis, preferiblemente inhibidores de la integrina, o inhibidores multiquinasa dirigidos al sitio ATP de moléculas pequeñas sobre la angiogénesis como tal.

La presente invención además hace referencia a métodos para el cribado de compuestos que modulan la integrina en un modelo basado en células.

En un primer aspecto, la invención está dirigida a un método para evaluar el efecto de un inhibidor de la angiogénesis, preferiblemente inhibidores de la integrina sobre la angiogénesis mediante biomarcadores moleculares informativos específicos. De ese modo, la invención se basa en particular en la necesidad de evaluar la eficacia de los inhibidores de la angiogénesis que deberían aplicarse a un individuo preferiblemente en el contexto de una terapia anti- angiogénica. Dicha terapia anti- angiogénica será aplicada para tratar enfermedades asociadas a la angiogénesis que se describen en el apartado de antecedentes. En otro aspecto, la invención está dirigida al uso de dichos biomarcadores moleculares informativos para determinar y predecir la eficacia de un inhibidor de ese tipo en el diagnóstico y terapia de un paciente que sufre de angiogénesis, preferiblemente una enfermedad relacionada con la integrina.

Existen diferentes indicaciones que han de considerarse en el establecimiento de biomarcadores moleculares informativos que deberían evaluar la eficacia de los inhibidores de la angiogénesis administrados a un individuo en el contexto de una terapia anti- angiogénica.

Por ejemplo, debido a que las terapias anti- angiogénicas podrían ser administradas a individuos que sufren de diferentes tipos de enfermedades asociadas a la angiogénesis, y diferentes tipos de tejidos y/o órganos podrían estar afectados por dicha enfermedad, es difícil o incluso, por razones médicas, no es posible obtener suficientes biopsias para el análisis de biomarcadores moleculares. Más aún, si los inhibidores de la angiogénesis se utilizan por ejemplo para fijar como diana un tumor que hace metástasis en un individuo, serían necesarias diferentes biopsias de varios tejidos diana para analizar el efecto de dichos inhibidores. Por lo tanto, la evaluación de la progresión tumoral dependiente de angiogénesis debido al tratamiento con inhibidores de la angiogénesis requerirían ciertas muestras de tejidos diferentes.

Además, debido a que la angiogénesis depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos y una gran cantidad de etapas angiogénicas implican proteínas en circulación, el éxito de una terapia anti- angiogénica no puede ser evaluada mediante el análisis de la aparición o desaparición de biomarcadores moleculares en un determinado tejido.

Por lo tanto, el uso de proteínas circulantes como biomarcadores debería proporcionar información sobre el éxito de una terapia anti- angiogénica. Dichas proteínas circulantes deberían ser detectables en fluidos corporales y por lo tanto podrían resultar ventajosas para superar las indicaciones analizadas. Los factores de crecimiento angiogénicos únicos elegidos, tales como el VEGF, bFGF y PLGF han sido analizados en el plasma sanguíneo después de la administración de ciertas terapias anti- angiogénicas (Jubb et al. 2006, Nature Reviews, 6, 626- 635). Pero la evaluación significativa de los factores de crecimiento angiogénicos en el plasma sanguíneo está restringida debido a la captación de muchos factores de crecimiento de las plaquetas y otras células. Además, las células tumorales expresan distintos niveles de dichos factores de crecimiento angiogénico. Además, debido a la complejidad de la angiogénesis y la complejidad de la circulación de proteínas, la evaluación de pocos biomarcadores individuales en una muestra no es eficiente para evaluar las terapias anti- angiogénicas. Por lo tanto, un panel de ciertos biomarcadores moleculares que preferiblemente pertenecen a diferentes familias de proteínas y que están implicadas en una diferente manera en la angiogénesis o en vías de señalización asociadas podría complementar la carencia de herramientas suficientes en la monitorización de fármacos anti- angiogénicos.

La invención hace referencia a ciertos biomarcadores moleculares que son secretados preferiblemente a partir de células de tejidos en su entorno debido a la administración de los inhibidores de la angiogénesis a un individuo y debido a su unión a su diana selectiva. Preferiblemente, estos biomarcadores moleculares podrían ser secretados de células de tejidos hacia su entorno y como consecuencia de lo mismo, podrían ser detectables en fluidos corporales. Por lo tanto, los fluidos corporales de un individuo tratados por dichos inhibidores se utilizaron preferiblemente para el análisis de los biomarcadores moleculares.

Los biomarcadores que son preferentes según la invención con respecto a su respuesta al tratamiento de algunos inhibidores de la angiogénesis específicos, son: ADAMTS1, STC1, EDN1, MCP1, IL8, PDGF-BB, CRP, ligando CD40, y la IL6.

Los biomarcadores preferentes según la presente invención son ADAMTS1, STC1, EDN1, y la IL8, o combinaciones de los mismos.

En un modo de realización preferente, los biomarcadores moleculares pueden ser detectados en fluidos corporales tales como la sangre y plasma sanguíneo, linfa, líquido cefalorraquídeo y/o la orina. En un modo de realización particularmente preferente, el biomarcador molecular puede ser detectado en orina y/o en sangre. En este caso, los biomarcadores pueden ser investigados con facilidad, ya que pueden tomarse muestras de sangre y orina de forma no invasiva.

En un modo de realización particularmente preferente, dicho inhibidor de la integrina se selecciona de DI-17E6 o su derivado y/o cilengitide (cyclo- (Arg- Gly- Asp- DPhe- NMeVal)). Al hacerlo, los biomarcadores moleculares serán

analizados en los fluidos corporales obtenidos de un individuo que se supone ha sido tratado con una cantidad terapéuticamente efectiva de DI-17E6 o su derivado y/o cilengitide.

- 5 En otro modo de realización preferente, dichos inhibidores de integrina se unen específicamente a integrinas de células endoteliales. De manera preferente, los biomarcadores moleculares serán incrementados de manera regulada en dichas células endoteliales y se secretarán en una cantidad mayor en el entorno de las células endoteliales. En otro caso, la secreción de dichos biomarcadores es comenzada debido al tratamiento con dichos inhibidores. El entorno de las células endoteliales comprende el lumen del vaso sanguíneo y el tejido vecino. En un modo de realización particularmente preferente, los biomarcadores moleculares alcanzan el flujo sanguíneo después de su secreción de las células endoteliales.
- 10 En otro modo de realización preferente de la invención, debido a la unión específica de dichos inhibidores de la integrina a células endoteliales, los biomarcadores moleculares son reducidos de manera regulada en dichas células endoteliales y se secretaron en una cantidad inferior en el entorno de las células endoteliales. En otro caso, la secreción de dichos biomarcadores se detiene debido al tratamiento con dichos inhibidores.
- 15 En un modo de realización de la presente invención, dichos biomarcadores moleculares, que pueden ser detectados en ciertos fluidos corporales debido al tratamiento con inhibidores de la integrina, son proteínas. De manera preferente, dichas proteínas son proteínas solubles del suero sanguíneo o proteínas comprendidas en el plasma sanguíneo. En un modo de realización de la presente invención, dichas proteínas pueden ser detectadas principalmente mediante técnicas basadas análisis inmunológicos, tales como Western blot, ELISA, Luminex y técnicas relacionadas.
- 20 Para el propósito de la presente invención, dichos biomarcadores, preferentemente proteínas, son o bien elevados o disminuidos cuantitativamente en el fluido corporal preferente en respuesta al tratamiento mediante inhibidores de la integrina. En un modo de realización preferente, la elevación o disminución de un determinado biomarcador debido al tratamiento de inhibidores de integrinas, caracterizado en múltiples ensayos, se defina por un valor p que no sobrepasa el valor 0,01.
- 25 En otro aspecto de la presente invención, dichos biomarcadores, preferiblemente proteínas, son modificadas en respuesta al tratamiento con inhibidores de integrinas. Estas modificaciones pueden incluir un cambio en el tamaño molecular de la proteína, modificaciones tales como la glicosilación en la proteína y las interacciones con diferentes o las mismas subunidades de proteínas.
- 30 En otro aspecto de la presente invención, la expresión génica de dichos biomarcadores puede ser detectada en el nivel de ARN. Por lo tanto, el ARN será extraído de muestras de células de tejidos de un individuo en respuesta al tratamiento con inhibidores de la integrina. Los transcritos de ARN expresados de ciertos biomarcadores, pueden por tanto ser analizados mediante técnicas de perfilado de la expresión génica tal como por ejemplo tecnología de arrays. De manera preferente, las muestras de células de tejidos que se toman para la extracción del ARN se derivan de células endoteliales.
- 35 De manera preferente, el método para evaluar la eficacia de los inhibidores de la integrina en terapias anti-angiogénicas comprende primero la administración de una cantidad presumiblemente terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la integrina a un individuo. La presunción y la determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva se basa en, por ejemplo, la investigación clínica y pre-clínica previa. En segundo lugar, la eficacia de la administración de presumiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho inhibidor de la integrina se evalúa mediante métodos de dicha invención. Se aduce a la evaluación de dicha valoración para repetir la terapia durante rondas adicionales bajo condiciones modificadas.
- 40
- 45 De acuerdo con un modo de realización de la presente invención, los biomarcadores son preferiblemente candidatos que han sido asociados con la angiogénesis y podrían estar implicados en vías de señales que están enlazadas a receptores de integrinas. Más preferiblemente, los biomarcadores podrían estar implicados en bloquear la angiogénesis a continuación de la administración de los inhibidores de la integrina. Otro aspecto hace referencia a la diversidad del grupo de biomarcadores de dicha invención. De manera preferente, no pueden agruparse debido a la gran homología de secuencias en una familia de proteínas y no pueden agruparse debido a su relevancia fisiológica en un grupo funcional tal como los factores angiogénicos VEGF, EGF y PLGF, etc.
- 50 En otro aspecto de la presente invención, para evaluar el efecto de un fármaco anti-angiogénico, los biomarcadores pueden ser utilizados individualmente, en combinación con diferentes biomarcadores de dicha invención o con otros biomarcadores de la angiogénesis determinados externos a la presente invención.

De manera adicional, los resultados de la evaluación de los biomarcadores moleculares obtenidos mediante la determinación de los niveles de proteínas en muestras tales como fluidos corporales, pueden lograrse por la determinación de los niveles de ARN en muestras tales como células endoteliales. Dicha comparación puede

resultar útil debido a que el biomarcador molecular en forma de transcrito de proteínas podrían, por ejemplo, no ser estables en sangre u orina debido a ciertas circunstancias fisiológicas.

En un segundo aspecto de la presente invención, la invención hace referencia a un método para evaluar el efecto de un inhibidor de la angiogénesis mediante biomarcadores moleculares por lo cual el método comprende las siguientes etapas: se obtuvo una muestra de tejido de un individuo antes de administrarle inhibidores de angiogénesis en donde se prepararon células del tejido de la muestra, de manera preferente células endoteliales. Dichas células fueron cultivadas bajo condiciones de laboratorio definidas *in vitro* y más tarde tratadas mediante inhibidores de la angiogénesis. Debido al tratamiento con inhibidores de angiogénesis la expresión y la secreción pueden continuarse en el medio de cultivo celular. En detalle, estos biomarcadores moleculares se secretan de dichas células hacia su entorno, es decir, el medio de cultivo debido al tratamiento con los inhibidores de la angiogénesis. Como resultado, son detectables en el medio de cultivo. En este caso, los biomarcadores moleculares pueden ser investigados y monitorizados fácilmente, ya que el medio de cultivo celular de las células cultivadas es fácil de manejar.

En un modo de realización preferente, los biomarcadores moleculares serán incrementados de manera regulada en las células endoteliales y se secretarán en una cantidad mayor hacia el medio de cultivo de las células endoteliales. En otro caso, la secreción de los biomarcadores comienza debido al tratamiento con dichos inhibidores. En otro modo de realización preferente de la invención, los biomarcadores moleculares son reducidos de manera regulada en las células endoteliales y se secretan en una cantidad inferior hacia el medio de cultivo de células endoteliales. En otro caso, la secreción de dichos biomarcadores se detiene debido al tratamiento con dichos inhibidores.

El método caracterizado por dichas etapas comprende un inhibidor de angiogénesis que se selecciona de manera preferible a partir de inhibidores de la integrina. En un modo de realización más preferente, dicho inhibidor de la integrina se selecciona de los inhibidores de la integrina alfa (V).

En un modo de realización particularmente preferente, dicho inhibidor de la integrina se selecciona de DI-17E6 o su derivado y/o el cilengtide. Al hacerlo, los biomarcadores moleculares serán analizados en el medio de cultivo celular obtenido de las células endoteliales, tratadas con una cantidad presumiblemente efectiva de DI-17E6 o su derivado y/o cilengtide.

En un modo de realización de la presente invención, dichos biomarcadores que pueden ser detectados en sobrenadantes debido al tratamiento mediante inhibidores de integrina son proteínas, tal como se describe en secciones anteriores.

Para el propósito de la presente invención dichos biomarcadores, preferiblemente proteínas, son o bien aumentadas o bien reducidas cuantitativamente en el sobrenadante de la muestra de células endoteliales en respuesta al tratamiento de los inhibidores de integrinas. En un modo de realización preferente, el aumento o la reducción de un determinado biomarcador debido al tratamiento de los inhibidores de la integrina caracterizados en ciertos ensayos está definido por un valor p que no sobrepasa el valor 0,01.

En otro aspecto de la presente invención dichos biomarcadores moleculares, preferiblemente proteínas que se detectan en el medio de cultivo celular se modifican tal como se describe en las secciones anteriores.

En otro aspecto de la presente invención el cambio en la expresión génica de dichos biomarcadores puede detectarse en el nivel de ARN mediante la extracción del ARN de las células endoteliales debido al tratamiento mediante los inhibidores de la integrina. Los transcritos del ARN expresados de ciertos biomarcadores pueden, por tanto ser analizados mediante técnicas de perfilado de expresión génica conocidas, tales como la tecnología de arrays.

El método para la evaluación del efecto de los inhibidores de la integrina en la angiogénesis en dicho sistema de cultivo celular descrito en la sección anterior comprende en primer lugar, la administración de una cantidad terapéutica presumiblemente efectiva de un inhibidor de la integrina a las células endoteliales. La determinación de la cantidad terapéutica presumiblemente efectiva se basa por ejemplo en la investigación clínica y pre-clínica previa. En segundo lugar, el efecto de la administración de una cantidad terapéutica presumiblemente efectiva de dicho inhibidor de la integrina es analizado mediante el biomarcador molecular descrito en dicha invención. Se aduce a la evaluación de dicha valoración para la determinación o la repetición de una terapia anti- angiogénica.

En otro aspecto, el método para la evaluación del efecto de los inhibidores de la integrina sobre la angiogénesis en dicho sistema de cultivo celular descrito en la sección anterior comprende en primer lugar la administración de una cantidad de estudio de un inhibidor de la integrina a células endoteliales. La determinación de una cantidad de estudio se basa por ejemplo, en la investigación clínica y pre-clínica previa. En segundo lugar, el efecto de la administración de una cantidad efectiva de estudio de dicho inhibidor de la integrina se analiza mediante el biomarcador molecular descrito en dicha invención. Se aduce a la evaluación de dicho análisis para una investigación clínica o pre-clínica adicional.

De acuerdo con un modo de realización de la presente invención los biomarcadores moleculares determinados en el medio de cultivo celular son preferiblemente candidatos que se describen en la sección anterior.

En otro aspecto de la presente invención, para evaluar el efecto de un fármaco anti- angiogénico, los biomarcadores pueden ser utilizados individualmente, en combinación con diferentes biomarcadores de dicha invención o con otros biomarcadores de angiogénesis determinados externos a la presente invención.

De manera adicional, la evaluación de los resultados de los biomarcadores moleculares obtenidos mediante la determinación del nivel de proteínas en los medios de cultivo celular pueden lograrse mediante los resultados de la expresión génica obtenidos mediante la determinación del nivel de ARN de las células del cultivo celular.

De manera adicional, la evaluación de los efectos inhibidores de la angiogénesis mediante biomarcadores moleculares pueden realizarse mediante el análisis combinado de muestras de tejido o bien fluidos corporales obtenidos de un individuo tratado con inhibidores de la integrina y la muestra de cultivo celular descrita anteriormente o bien el medio de cultivo celular de la misma.

De manera adicional, todos los métodos de dicha invención para evaluar los efectos del inhibidor de la angiogénesis mediante biomarcadores moleculares y su uso puede ser beneficioso para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades asociadas a la angiogénesis que están descritas en la sección de antecedentes.

En un aspecto adicional, la invención hace referencia a un método para la evaluación del efecto de un amplio rango de fármacos anti- angiogénicos mediante el uso de biomarcadores moleculares de dicha invención. Dichos biomarcadores podrían ser utilizados para evaluar el efecto de otros fármacos anti- angiogénicos sobre la angiogénesis que no están incluidos o relacionados con los fármacos anti- angiogénicos de dicha invención.

En otro aspecto, además del uso de dichos biomarcadores para la evaluación de los fármacos angiogénicos en el contexto de una terapia angiogénica, podrían además ser de interés en el descubrimiento precoz.

El método como se especifica en la presente puede proporcionar información sobre el éxito de una terapia anti-angiogénica de la siguiente manera. Dicho método puede ser utilizado para encontrar y optimizar una dosis efectiva y/o un programa de dosificación de un fármaco anti- angiogénico administrado a un paciente que sufre de una enfermedad asociada a la angiogénesis. En detalle, la eficacia de una terapia anti- angiogénica que comprende por ejemplo el tratamiento de un paciente que sufre de una enfermedad asociada a la angiogénesis con un fármaco anti-angiogénico por ejemplo, un inhibidor de la integrina en una dosis inicial que se asume es efectiva puede ser evaluada mediante el método de dicha invención. Si la eficacia de dicha terapia anti- angiogénica parece bajar por ejemplo, puede aplicarse a dicho paciente condiciones modificadas tales como la variación de la dosis y/o el programa de administración y/o la elección del fármaco anti- angiogénico. El método de dicha invención puede repetirse durante ciclos adicionales debido a condiciones de terapia anti- angiogénica modificada hasta que la terapia individual óptima para dicho paciente se encuentra.

En otro aspecto preferente, si la dosis inicial de un fármaco anti- angiogénico administrado a un paciente que sufre de una enfermedad anti- angiogénica es evaluado como efectivo por el método de dicha invención, las condiciones modificadas podrían comprender la disminución de una dosis o la ampliación del programa. Un beneficio de disminuir la dosis de los compuestos, composiciones, agentes y terapias administradas a un individuo incluye una disminución en la incidencia de efectos adversos asociados con dosis mayores. Como resultado del método tal como se reivindica y se describe en más detalle en los ejemplos, la terapia podría consistir en cambiar el fármaco actual y reemplazarlo por otro fármaco que causa un patrón del biomarcador más distintivo.

Dichos biomarcadores pueden además ser utilizados para la investigación de la homeostasis o angiogénesis de células endoteliales, en general. La evaluación de dichos biomarcadores podría proporcionar información en experimentos que tienen el alcance de obtener una mejor comprensión de dichos procesos fisiológicos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la invención proporciona un método para el cribado de un compuesto con posible actividad de modulación de la integrina. El método comprende

(a) determinar la concentración de referencia y/o el estado de modificación de un fluido corporal y/o tejido, por el cual se obtiene la muestra de un individuo que no ha sido tratado con dicho inhibidor;

(b) determinar la concentración y/o el estado de modificación de dichos biomarcadores seleccionados en una muestra de (a) que ha sido tratada con dicho inhibidor.

(c) calcular las diferencias entre las concentraciones y/o el estado de modificación de los biomarcadores seleccionados obtenidos en la etapa (a) y (b);

(d) evaluar o predecir a partir de dichas diferencias indicativos de una molécula de modulación de integrinas con efecto sobre la angiogénesis y/o eficacia anti- angiogénica sobre la enfermedad asociada a la angiogénesis;

5 En un modo de realización preferente, la administración del compuesto de interés se realiza en diferentes dosis que se estiman en el rango de una posible actividad de modulación de integrinas a células, preferiblemente células endoteliales, para obtener células tratadas.

En un modo de realización preferente, se tomaron los medios de cultivo celular de dichas células tratadas para el análisis tal como se describe en secciones anteriores.

10 En un modo de realización preferente, dichos biomarcadores que se analizan y monitorizan en medios de cultivo celular en respuesta al tratamiento con dichos compuestos de cribado son proteínas, como se describe en las secciones anteriores,

En un modo de realización preferente, el aumento o la disminución de un determinado biomarcador debido al tratamiento con compuestos de cribado caracterizados en determinados ensayos, se define por un valor p que no sobrepasa el valor de 0,01.

15 En otro aspecto de la presente invención dichos biomarcadores, de manera preferente proteínas, se modifican en respuesta al tratamiento con dichos compuestos de cribado como se ha descrito en secciones anteriores.

En otro aspecto de la presente invención el cambio de la expresión génica de dichos biomarcadores puede detectarse en el nivel de ARN mediante la extracción de ARN de células tratadas por los compuestos de cribado. Los transcritos del ARN expresado de ciertos biomarcadores pueden por tanto ser analizados mediante técnicas de perfilado de la expresión génica tales como la tecnología de arrays.

20 Para resumir, la invención hace referencia a:

- Un método *ex vivo* para evaluar el efecto de un inhibidor de la angiogénesis y/o la eficacia de dicho inhibidor sobre una enfermedad asociada a la angiogénesis, mediante al menos un biomarcador selectivo, en donde los biomarcadores se seleccionan a partir de productos génicos seleccionados del grupo que consiste en ADAMTS1, STC1, EDN1, MCP-1, IL-8, PDGF-BB, CRP, ligando CD40 e IL-6.

25 donde el método comprende las etapas:

(a) determinar la concentración de referencia y/o el estado de modificación de al menos un biomarcador seleccionado en una muestra de un fluido corporal o tejido, mediante el cual se obtiene la muestra de un individuo que no ha sido tratado con dicho inhibidor,

30 (b) determinar la concentración y/o el estado de modificación de dichos biomarcadores seleccionados en una muestra (a) obtenida de un individuo que ha sido tratado con dicho inhibidor o en una muestra de (a) que es tratada en una etapa posterior con dicho inhibidor.

(c) calcular las diferencias entre las concentraciones y/o el estado de modificación de los biomarcadores seleccionados obtenidos mediante la etapa (a) y (b);

(d) evaluar o predecir a partir de dichas diferencias una o más de las siguientes propiedades de los inhibidores:

35 - efectos farmacodinámicos sobre la diana molecular y sobre las respectivas vías de señalización enlazadas a la diana molecular,

- el efecto sobre la angiogénesis,

- la eficacia del tratamiento y el resultado clínico en un paciente con una enfermedad asociada a la angiogénesis.

40 • un método correspondiente *ex vivo*, en donde la muestra tomada de fluido corporal es sangre, plasma, suero, linfa, orina, lágrimas, líquido sinovial, exudado de heridas y/o líquido cefalorraquídeo.

• un método correspondiente, en donde la muestra de tejido comprende un tejido enfermo o sano.

• un método correspondiente, en donde la muestra de tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido cancerígeno, tejido de la piel y/o tejido sinovial.

- un método correspondiente *ex vivo*, en donde se preparan células endoteliales a partir de la muestra de tejido tomada.
- un método correspondiente, en donde las células endoteliales se cultivan bajo condiciones de laboratorio después de que hayan sido obtenidas de un individuo y preparadas a partir de una muestra de tejido en donde al menos un biomarcador se determina del medio de cultivo celular o extracto de dichas células.
- un método correspondiente, en donde el inhibidor de la angiogénesis es un inhibidor de la integrina.
- un método correspondiente en donde el inhibidor de las integrinas alfa (V) es un anticuerpo, o derivado del mismo o una molécula química pequeña o un péptido RGD.
- un método correspondiente en donde el inhibidor de las integrinas alfa (V) es DI-17E6 o cilengitide.
- un método en donde el biomarcador ADAMTS1 se incrementa de forma regulada debido a la administración de al menos un inhibidor de integrina según se ha especificado.
- un método correspondiente en donde el biomarcador MCP1, INHBA, EDN1 y/o PDGF-BB se reduce de manera regulada debido a la administración de un inhibidor de la integrina según se ha especificado.
- un correspondiente método en donde el biomarcador IL8 se reduce de manera regulada debido a la administración de cilengitide, y se incrementa de manera regulada debido a la administración de DI-17E6.
- un método correspondiente en donde el biomarcador IL6 y/o CRP se incrementa de manera regulada debido a la administración de DI-17E6.
- un método correspondiente en donde el biomarcador ligando CD40 se reduce de manera regulada debido a la administración de DI-17E6.
- uso de un gen biomarcador o su producto génico seleccionado del grupo preferente que consiste en ADAMTS1, STC1, EDN1, MCP1, IL8, PDGF-BB, CRP, ligando CD40 e IL6 para evaluar y predecir el efecto de un inhibidor de la integrina sobre la angiogénesis en un ensayo basado en células, o la eficacia y/o dosificación de un inhibidor *ex vivo* de ese tipo.
- uso de un gen biomarcador o su producto génico seleccionado del grupo preferente que consiste en ADAMTS1, STC1, EDN1, MCP1, IL8, PDGF-BB, CRP, ligando CD40 e IL6 para la elaboración de un inhibidor de la integrina para el tratamiento del cáncer en pacientes que responden a al menos uno de estos biomarcadores.

Descripción detallada de la invención

El término “enfermedad asociada a angiogénesis” contribuye a diversas enfermedades o trastornos que son el resultado directo de la angiogénesis desregulada o desviada en un efecto indirecto por la angiogénesis desregulada. Estas numerosas enfermedades incluyen los trastornos tumorales, enfermedad cardiovascular, inflamaciones, enfermedades autoinmunes, trastornos degenerativos, trastornos oculares. La angiogénesis desregulada podría estar inducida por diversos estímulos patológicos.

El término “efecto anti- angiogénico” significa que la angiogénesis es bloqueada o al menos inhibida. En el contexto de la presente invención, de manera preferente, se utilizan fármacos anti- angiogénicos para antagonizar una enfermedad asociada a la angiogénesis limitando la formación patológica de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y se mejoran los síntomas de dicha enfermedad mediada por angiogénesis debido a la administración de fármacos anti- angiogénicos.

El término “biomarcador” hace referencia a una sustancia que se utiliza como indicador de un estado biológico. Es una característica que se mide de manera objetiva y se evalúa como un indicador de procesos biológicos habituales, procesos patológicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. En la presente invención, el término biomarcador se utiliza de manera preferente como un biomarcador molecular que incluye transcritos génicos tales como ARN y proteínas. Dicho biomarcador puede cambiar cuantitativamente además de cualitativamente. De manera preferente en la presente invención, los biomarcadores moleculares cambian cuantitativamente, es decir, su nivel se reduce o aumenta, por lo cual el valor *p* que caracteriza la fiabilidad de un biomarcador examinado en determinados ensayos bajo las mismas condiciones no sobrepasa el valor de 0,01.

El término “fluidos corporales” incluye fluidos que se encuentran en los individuos. Estos incluyen fluidos que son excretados o secretados del cuerpo, además de fluidos que habitualmente no lo son. Estos fluidos respectivos

incluyen humor acuoso, sangre, suero, líquido intersticial, linfa, moco, líquido pleural, saliva, orina, lágrimas, líquido sinovial, exudado de heridas y/o líquido cefalorraquídeo. De manera preferente, en la presente invención se utilizan la sangre, incluyendo suero sanguíneo y plasma sanguíneo, y la orina.

5 Los términos "cáncer" y "tumor/ trastorno tumoral" hacen referencia a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por el crecimiento celular no regulado. Mediante composiciones farmacéuticas según la presente invención, pueden tratarse tumores tales como tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula espinal, sangre, timo, útero, testículos, cuello uterino, e hígado.

10 El término "ensayo/ modelo basado en células" hace referencia en la presente patente a células que se derivan de tejidos y/o órganos animales o humanos que son, más preferiblemente, cultivados bajo condiciones de laboratorio previamente a su utilización para el cribado de los compuestos de modulación de la angiogénesis. Un modelo basado en células incluye también una línea celular.

Un "derivado" de un anticuerpo representa una forma deducida de un anticuerpo.

15 El término "kit de diagnóstico" incluye, de manera preferente, un sistema de detección con diferentes envases de anticuerpos de diagnóstico y/o matrices génicas y/o reactivos que son necesarios para la evaluación cuantitativa y/o cualitativa del biomarcador de la presente invención y, como norma, instrucciones para la utilización de reactivos, anticuerpos de diagnóstico o matrices génicas. Los anticuerpos, además del reactivo, pueden proporcionarse como un líquido, polvo, comprimido, suspensión. Los anticuerpos, es decir las matrices génicas y los reactivos, pueden proporcionarse en envases individuales adecuados para su aplicación por separado, según el presente método. Un
20 kit de la presente invención además contiene "instrucciones de uso" de los materiales contenidos en el envase.

El término "estado de modificación" hace referencia a un cambio de modificaciones en los productos génicos tales como modificaciones en el tamaño molecular o glicosilaciones de proteínas. Además, hace referencia a un cambio en las interacciones con diferentes proteínas o con las mismas subunidades de proteínas.

25 Un "individuo" incluye animales y humanos que padecen de una enfermedad/ trastorno y/o que están saludables como probandos de control. Además, se incluyen animales de laboratorio.

Un "receptor" o "molécula receptora" es una proteína soluble o asociada / unida a una membrana, o una glicoproteína que comprende uno o más dominios a los que se une un ligando para formar un complejo ligando-receptor. Mediante la unión al ligando, que puede ser un agonista o un antagonista, el receptor es activado o inactivado y puede iniciar o bloquear una vía de señalización.

30 Una "muestra de tejido" significa una biopsia que es extraída de un individuo para utilizar este material, preferiblemente en lo que se refiere a células, para el análisis y la evaluación de biomarcadores. En la presente invención, una muestra de tejido podría ser utilizada directamente después de la biopsia para el análisis de biomarcadores. En otro aspecto de la presente invención, las células extraídas del material de la biopsia podrían ser cultivadas bajo determinadas condiciones de laboratorio y analizadas para sus biomarcadores en un momento
35 posterior. En la presente invención, se utilizan preferiblemente células endoteliales.

El término "dosis terapéuticamente efectiva=DTE" hace referencia a una cantidad de un fármaco por ejemplo, un anticuerpo terapéutico, efectivo para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferiblemente detener), la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerígenas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia anti- tumoral, la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo libre de progresión de la enfermedad (TTP, por sus siglas en inglés), y/o
45 determinar la tasa de respuesta (RR, por sus siglas en inglés).

El término "respuesta" o "reactividad" hace referencia a una condición que puede ser evaluada utilizando cualquier parámetro de indicación de un beneficio para un paciente, incluyendo, sin limitación, la inhibición en cierta medida de la progresión de la enfermedad, incluyendo la ralentización o una detención completa; reducción en el número de episodios y/o síntomas de la enfermedad; reducción de las respuestas auto-inmunes contra el fármaco inhibidor aplicado; aumento en el periodo de presentación libre de enfermedad a continuación del tratamiento; y reducción de la mortalidad en un punto dado de tiempo a continuación del tratamiento. El término hace referencia a una respuesta medible que incluye una respuesta completa (CR) y una respuesta parcial (PR).

Versiones murinas, quiméricas o humanizadas de un anticuerpo en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos o derivados equivalentes, en donde las porciones de anticuerpo se sustituyen según las definiciones de los anticuerpos murinos, anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados.

En este estudio, se identificaron biomarcadores ligados a la actividad anti- angiogénica de los inhibidores de la integrina, e inhibidores multiquinas dirigidos al sitio ATP de moléculas pequeñas a los que se puede acceder en fluidos corporales y por lo tanto podrían permitir el análisis de la modulación de la diana en una forma no invasiva. Para ello, se aplicaron dos estrategias diferentes. En primer lugar, se analizaron cambios de todo el genoma en los perfiles de la expresión génica de células endoteliales en respuesta al tratamiento con el fármaco. En segundo lugar, se realizó una aproximación dirigida al candidato utilizando un modelo de angiogénesis *in vivo* para identificar biomarcadores de plasma regulado por fármacos.

1. Identificación de biomarcadores utilizando perfiles de expresión génica

Para identificar biomarcadores asociados con el tratamiento, se trataron células HUVEC con cilengitide o DI-17E6. El análisis western blot reveló que a continuación del tratamiento se inhibió la fosforilación de FAK y MAPK para el cilengitide, y para DI-17E6, respectivamente. Los perfiles de expresión génica se generaron a partir de experimentos con cada condición probada por triplicados. Para ello, se extrajo ARN de células de control y tratadas, y se hibridó con micromatrices de nucleótidos de Affymetrix de todo el genoma para generar perfiles de expresión génica. Después del procesamiento previo con el algoritmo GCRMA (Wu Z, Journal American Statistical Association 2004; 99: 909-917), se filtraron datos de GeneChips de Affymetrix para excluir conjuntos de sondas con baja variabilidad, baja señal o anotación de deficiente de la sonda. Los genes se filtraron de manera específica para obtener candidatos que podrían ser detectables en fluidos corporales en humanos y podrían ser monitorizados de manera no invasiva en pacientes. Se identificaron genes expresados diferencialmente entre las células tratadas y las no tratadas, o en células tratadas-de control mediante análisis de los datos de expresión de cada conjunto de sondas, seguido por pruebas T moderadas (Smyth GK, Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology 2004; 3: Article 3).

• Los genes incrementados de manera regulada en respuesta a DI-17E6 incluyen ADAMTS1, ADAMTS9, SERPINB2, SERPIND2, STC1, ADAM15, SRPX, CORO1C, PBEF1, LTB4DH, IL15RA, ENPP4, PLAUR, LAMA5, TNFRSF1A, CLU, TOR3A, IL1RL1, IL1R1, TCN2, VEGFC, LMNA, CTSL, PTX3, NCL, GUSB, CLEC3B, IL8, GPX3, CXCL1, SDFR1, STAT1, CDCA7.

• Los genes incrementados de manera regulada en respuesta al Cilengitide incluyen ADAMTS9, DAF, STC1, ADAMTS1, LAMA5, TCN2, SRPX, ADAM15, GUSB, HYAL2, PLAUR, CD40, NOTCH1, ENPP4.

• Los genes reducidos de manera regulada en respuesta al DI-17E6 incluyen INHBA, EDN1, MCP1, MMP10, AUTS2, LIPG, PDGFB, BMP4, MGP, HTRA1, FBLN5, HHIP, COL4A1, GALNT, MMP2, IL13RA1, MFAP2, NTN4, DKK3, SERPINE2, COL5A1, CHST1, PGF, EFNA4, BCHE, ENG, ROR1, ANGPTL4, ESM1, CUBN, IGFBP7, CYR61, FLT4, SPOCK, COL12A1, LTBP1, MMP28, TMEM4, CTSE, COL1A2, GRP124, SPARC.

• Los genes reducidos de manera regulada en respuesta al cilengitide incluyen INHBA, EDN1, FST, DKK4, BMP4, MCP1, HHIP, NTN4, PHLDB2, PVR, CYR61, AUTS2, MERTK, FSTL3, APLN, PTX3, ANGPTL4, CTGF, SPOCK, IL8, NRG1, DKK3, CD44, BCHE, BDNF, FBXO4, EFEMP1, STC2.

Los genes que muestran, bajo determinadas condiciones, una respuesta / cambio de respuesta / reactividad extraordinaria están subrayados.

Los genes y los productos génicos de dichos genes comprenden por la definición según la presente invención, además secuencias homólogas que suscitan la misma actividad funcional; en especial, se tratan de secuencias que tienen una homología con dichas secuencias originales de más del 80%, preferiblemente de más del 90% y especialmente más del 95%. Por tanto, secuencias que tienen las siguientes homologías son el objeto de la presente invención: 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, y 99%.

Los genes que se regularon de manera muy significativa en el nivel de ARN mediante cualquier inhibidor de la integrina, fueron analizados en el nivel de proteínas. Debido a que los biomarcadores secretados son relevantes, los candidatos individuales fueron analizados en sobrenadantes de células tratadas con inhibidores de integrina. Las células HUVEC se trataron o bien con DI-17E6 o con cilengitide. Tras diferentes tiempos, los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y analizaron para diferentes candidatos de biomarcadores, mediante análisis de Western Blot, ELISA o Luminex. La regulación de biomarcadores inducida por fármacos se evaluó en comparación con células de control. Entre los diferentes candidatos, se observó que ADAMTS1, STC-1, MCP-1, IL-8, Endotelina-1, activina A y PDGF-BB estaban regulados en su respuesta a los inhibidores de la integrina.

Los análisis de Western blot revelaron que el motivo ADAM metalopeptidasa con trombospondina de tipo 1 (**ADAMTS1**) y la estaniocalcina- 1 (**STC-1**) se incrementaron de manera regulada en respuesta al tratamiento con DI-17E6 o cilengitide (Figura 2-4). ADAMTS1 es una metaloproteasa que reside en el espacio extracelular. Utilizando diferentes sistemas biológicos, se ha demostrado que ADAMTS1 inhibe la angiogénesis (Vazquez F. et al., J Biol Chem 1999; 274 (33) : 23349- 57). La STC-1 es una glicoproteína secretada que ha sido descrita originalmente como una hormona implicada en la homeostasis del fosfato y el calcio en osteocitos. Juega un papel en muchos procesos fisiológicos que incluyen la angiogénesis, y se han descrito actividades tanto pro- como anti-angiogénicas para STC-1 (Filvaroff EH. Et al., Endocrinology 2002; 143: 3681- 90; Zlot C. et al., J Biol Chem. 2003; 278 (48) : 47654- 9).

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (**MCP-1/CCL2**) y la interleucina- 8 (**IL- 8/CXCL8**) fueron analizadas mediante Luminex. La MCP- 1 se redujo de manera regulada en respuesta al DI-17E6 y el cilengitide (Figura 5). En contraste, la **IL-8** fue regulada diferencialmente por ambos inhibidores de la integrina. En respuesta al DI-17E6 la IL- 8 se incrementó de manera regulada, mientras que el cilengitide indujo una reducción regulada de esta quimiocina (Figura 6). La MCP-1 juega un papel crítico en el reclutamiento y activación de macrófagos. Es uno de los agonistas clave para atraer macrófagos pro- angiogénicos a los tumores. La inhibición de MCP-1 reduce la angiogénesis y el crecimiento tumoral en ratones (Koga M. et al., Biochem Biophys Res Commun. 2008; 365 (2) : 279- 84). Se conoce que la IL- 8/CXCL8 inicialmente caracterizada para su actividad quimiotáctica de los leucocitos, posee propiedades tumorígenas y pro- angiogénicas (Xie K et al., Cytokine Growth Factor Rev 2001; 12 (4) : 375- 91).

Se analizó la **activina A**, endotelina- 1 (**EDN1**) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (**PDGF-BB**) mediante ELISA. Todas las tres proteínas se redujeron de manera regulada en respuesta al DI-17E6 y al cilengitide (Figura 7-9). La EDN1 actúa de mediadora en las actividades que promueven tumores múltiples, incluyendo la angiogénesis. Regula la quinasa ligada a integrina (ILK), una proteína de adhesión focal multi-dominio que porta la señalización intracelular suscitada por las integrinas (Rosano L. et al., Mol Cancer Ther. 2006; 5 (4) : 833- 42). La activina A, un homodímero de dos subunidades de la inhibina β A, es un miembro de la familia activina/ inhibina, que pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Emplea un gran espectro de actividades biológicas que incluyen procesos de desarrollo y reproductivos, inflamación, cáncer y angiogénesis. El papel de la activina A en la regulación de la angiogénesis es forzado, ya que se han descrito funciones tanto pro- como anti- angiogénicas (Panopoulou E et al., Cancer Res. 2005; 65 (5) : 1877- 86; Poulaki V. et al., Am J Pathol. 2004; 164 (4) : 1293- 302). PDGF- BB es uno de los cuatro ligandos PDGF, PDGF- A, PDGF- B, PDGF- C y PDGF- D (Fredriksson L et al., Cytokine Growth Factor Rev. 2004; 15: 197- 204). Pertenece a la superfamilia VEGF/ PDGF de ligandos y receptores, agrupados en base a su cercana homología de secuencias y su relación evolutiva. PDGF- BB es frecuentemente expresado en niveles altos en diversos tejidos tumorales (Nguyen M. et al., J. Natl. Cancer Inst. 1994; 86: 356- 361). Es un factor mitogénico y quimiotáctico para pericitos y juega un papel crucial en la regulación de las células vasculares durante el ensamblaje de la pared de los vasos sanguíneos (Lindahl P et al., Science 1997; 277: 242- 245).

En resumen, biomarcadores específicos a fármacos que se correlacionan con efectos farmacodinámicos de los inhibidores de la integrina, han sido identificados en perfiles de expresión génica en cultivos endoteliales. Varios de los candidatos identificados fueron confirmados como proteínas reguladas por fármacos en sobrenadantes celulares, indicando que podrían ser detectables en fluidos corporales. Algunos de los candidatos fueron también regulados mediante inhibidores multi-quinasa no regulados, lo que sugiere que los biomarcadores podrían aplicarse en un amplio sentido para monitorizar efectos sobre la homeostasis y la angiogénesis de las células endoteliales (mostrada con propósitos comparativos en las Figuras 10-12).

2. Identificación de biomarcadores de plasma regulado por fármacos mediante un modelo de angiogénesis in vivo

En este modelo, la angiogénesis fue inducida en ensayo con plugs (soportes) de Matrigel por el factor de crecimiento angiogénico bFGF. Los plugs de Matrigel que contenían el bFGF fueron implantados de manera subcutánea en el abdomen de monos *Cynomolgus*, y se inyectó a los animales DI-17E6 por vía intravenosa en diferentes dosis inmediatamente después. La evaluación de la angiogénesis se llevó a cabo después de la implantación con plugs de Matrigel. Cada condición se sometió a ensayo en diferentes animales a los que se habían implantado plugs de Matrigel. Se observó que el tratamiento de los monos con DI-17E6 bloqueó la formación de nuevos vasos sanguíneos en todas las dosis (Figura 13).

Para identificar biomarcadores que se correlacionan con efectos PD del DI-17E6, las muestras de plasma se recogieron antes del tratamiento y después del tratamiento. Las concentraciones absolutas de diferentes proteínas fueron medidas mediante Luminex, mediante comparación con estándares respectivos. Los datos en bruto fueron procesados previamente mediante transformación logarítmica y el efecto de DI-17E6 fue examinado en un análisis con una prueba T, comparando grupos DI-17E6 con animales tratados con placebo en cada punto de tiempo.

Las proteínas que fueron reguladas de manera significativa incluyen la proteína C reactiva (CRP) y la IL-6, el ligando CD40 y MMP9. La CRP y la IL-6 fueron incrementadas de manera regulada en respuesta al tratamiento con DI-17E6 (Figura 14). Por el contrario, el ligando CD40 y MMP9 fueron regulados específicamente en el grupo de control.

Después de 144h, el ligando CD40 fue reducido de manera regulada y el MMP9 fue incrementado de manera regulada en animales tratados con placebo (Figura 15). La CRP es un marcador de la inflamación y un mediador clave de la respuesta en fase aguda (Pepys MB et al., Adv Immunol 1983; 34: 141- 212). Reconoce células dañadas, inicia su eliminación mediante la interacción con el sistema inmune y podría por tanto estar implicada en la eliminación de células que han sido dañadas en respuesta al tratamiento con DI-17E6. La IL-6 es una citocina pleiotrópica asociada con la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Keller ET et al., Front. Biosci. 1996. 1: 340- 357 y Ancrile B et al., Genes Dev. 2007 Jul; 21 (14) : 1714- 9). El incremento de manera regulada de la IL-6 en respuesta al tratamiento con DI-17E6 parece conflictivo con su actividad farmacológica, pero podría reflejar un bucle de retroalimentación, según ha sido observado para otros inhibidores de la angiogénesis. El ligando CD40 es una proteína transmembrana estructuralmente relacionada con el factor de necrosis tumoral α . En un factor pro-coagulante y pro- inflamatorio que contribuye a la inflamación, la trombosis y la neoangiogénesis (Ferroni P et al., Curr Med Chem. 2007; 14 (20) : 2170- 80). Por último, la MMP9 pertenece a la familia de las metaloproteinasas matriciales que juegan un papel en la mediación de la homeostasis del entorno extracelular. Tanto la actividad pro-como anti- tumorigena han sido descritas (Egeblad M et al., Nature Rev. Cancer 2002; 2: 161- 174). Modula la remodelación de nuevos vasos y promueve el crecimiento tumoral (Seandel M et al., Cancer Cell 2008; 13 (3) : 181- 3).

En resumen, han sido detectados biomarcadores de plasma farmacodinámicos específicos a fármacos, que podrían ser detectados en fluidos corporales en humanos y podrían ser utilizados para proporcionar prueba de concepto para la modulación de la diana; seleccionar dosis y programa apropiados; y explicar potencialmente o predecir resultados clínicos. De los biomarcadores identificados, la CRP y MMP9 podrían estar mecanísticamente implicados en el bloqueo de la angiogénesis a continuación del tratamiento con DI-17E6.

3. Resumen

En estos dos estudios se han identificado diversos biomarcadores PD para inhibidores de integrina e inhibidores multi-quinasa que podrían ser detectables en fluidos corporales en humanos y podrían ser utilizados para proporcionar prueba de concepto para la modulación de dianas; proporcionar selección racional de dosis y programa; y potencialmente explicar o predecir resultados clínicos. Curiosamente, algunos biomarcadores fueron regulados por fármacos no relacionados con diferente mecanismo de acción que sugiere que podrían ser utilizados para monitorizar los efectos sobre la homeostasis y angiogénesis en células endoteliales en general, y por tanto son adecuados para ser aplicados a diferentes tipos de fármacos, incluyendo inhibidores de integrinas (tal como cilengitide, DI-17E6), los inhibidores VEGF (tal como la Avastina), inhibidores de la multiquinasa (tales como el Sunitinib, Sorafenib).

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1: muestra secuencias de la cadena liviana (A) y pesada (B) completas de DI-17E6. Las regiones variables se encuentran subrayadas con los CDR en negrita. Las secuencias en negrita en la región constante indican la región bisagra de IgG1 y la mutación en las posiciones 296 y 297.

Figura 2: presenta que el DI-17E6 induce niveles de la proteína ADAMTS1 en sobrenadantes de HUVEC.

Figura 3: representa que el cilengitide induce niveles de la proteína ADAMTS1 en sobrenadantes de HUVEC.

Figura 4: representa que el DI-17E6 y el cilengitide inducen niveles de proteínas de STC-1 en sobrenadantes de HUVEC.

Figura 5: presenta la regulación de MCP-1 en células HUVEC en respuesta al DI-17E6 y cilengitide.

Figura 6: representa la regulación de la IL-8 en células HUVEC en respuesta al DI-17E6 y cilengitide.

Figura 7: representa el PDGF-BB en células HUVEC en respuesta al DI-17E6 y el cilengitide.

Figura 8: presenta la regulación de EDN1 en células HUVEC en respuesta al DI-17E6 y cilengitide.

Figura 9: presenta la regulación de la activina A en células HUVEC en respuesta al DI-17E6 y al cilengitide.

Figura 10: presenta la regulación de STC-1 en células de HUVEC en respuesta al suturent y sorafenib (con propósitos comparativos)

Figura 11: presenta la regulación de EDN1 en células HUVEC en respuesta al suturent y sorafenib (con propósitos comparativos).

Figura 12: presenta la regulación de la IL-8 en células HUVEC en respuesta al sutent y sorafenib (con propósitos comparativos).

Figura 13: presenta la inhibición del DI-17E6 de la angiogénesis en ensayo con plugs de Matrigel en monos.

Figura 14: presenta la regulación de la CRP y de la IL-6 en plasma en respuesta al tratamiento con DI-17E6.

- 5 Figura 15: presenta la regulación del ligando CD40 y MMP9 en plasma en respuesta al tratamiento con DI-17E6.

Figura 16: presenta la inhibición de las vías de señalización específicas a la integrina.

Ejemplos

Ejemplo 1:

DI-17E6 induce niveles de la proteína ADAMTS1 en sobrenadantes de HUVEC

- 10 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de DI-17E6 durante 6h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para ADAMTS1 mediante análisis de western blot. A) DI-17E6 actuó de mediador en la regulación de ADAMTS1 (65kD y 85kD) (Figura 2).

Ejemplo 2:

- 15 El cilengitide induce niveles de la proteína ADAMTS1 en sobrenadantes de HUVEC

Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de cilengitide durante 6h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para ADAMTS1 mediante análisis de western blot. A) cilengitide actuó de mediador en la regulación de ADAMTS1 (65kD y 85kD) (Figura 3).

- 20 **Ejemplo 3:**

El DI-17E6 y el cilengitide inducen niveles de STC-1 en sobrenadantes de HUVEC

- 25 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de DI-17E6 o cilengitide durante 24h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para STC-1 mediante análisis de western blot. A) Regulación de STC-1 en respuesta a DI-17E6. B) Regulación de STC-1 en respuesta al cilengitide (Figura 4).

Ejemplo 4:

Regulación de MCP-1 en células HUVEC en respuesta a DI-17E6 y al cilengitide

- 30 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de DI-17E6 o cilengitide durante 6h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para MCP-1 mediante Luminex. A) Regulación de MCP-1 en respuesta a DI-17E6. B) Regulación de MCP-1 en respuesta al cilengitide (Figura 5).

Ejemplo 5:

Regulación de IL-8 en células HUVEC en respuesta a DI-17E6 y al cilengitide

- 35 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de DI-17E6 o cilengitide durante 6h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para IL-8 mediante Luminex. A) Regulación de IL-8 en respuesta a DI-17E6. B) Regulación de IL-8 en respuesta al cilengitide (Figura 6).

Ejemplo 6:

Regulación de PDGF-BB en células HUVEC en respuesta a DI-17E6 y al cilengitide

Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de DI-17E6 o cilengitide durante 6h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para PDGF-BB mediante ELISA. A) Regulación de PDGF-BB en respuesta a DI-17E6. B) Regulación de PDGF-BB en respuesta al cilengitide (Figura 7).

5 **Ejemplo 7:**

Regulación de EDN1 en células HUVEC en respuesta a DI-17E6 y al cilengitide

10 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de DI-17E6 o cilengitide durante 6h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para EDN1 mediante ELISA. A) Regulación de EDN1 en respuesta a DI-17E6. B) Regulación de EDN1 en respuesta al cilengitide (Figura 8).

Ejemplo 8:

Regulación de activina A en células HUVEC en respuesta a DI-17E6 y al cilengitide

15 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de DI-17E6 o cilengitide durante 6h a 72h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para activina A mediante ELISA. A) Regulación de activina A en respuesta a DI-17E6. B) Regulación de activina A en respuesta al cilengitide (Figura 9).

Ejemplo 9: (con propósitos comparativos)

Regulación de STC-1 en células HUVEC en respuesta al Sutent y al Sorafenib

20 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de Sutent o Sorafenib durante 6h a 48h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para STC-1 mediante análisis de Western Blot. A) Regulación de STC-1 en respuesta a Sutent. B) Regulación de STC-1 en respuesta al Sorafenib (Figura 10).

Ejemplo 10: (con propósitos comparativos)

Regulación de EDN1 en células HUVEC en respuesta al Sutent y al Sorafenib

25 Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de Sutent o Sorafenib durante 6h a 48h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para EDN1 mediante ELISA. A) Regulación de EDN1 en respuesta a Sutent. B) Regulación de EDN1 en respuesta al Sorafenib (Figura 11).

Ejemplo 11: (con propósitos comparativos)

30 Regulación de IL-8 en células HUVEC en respuesta al Sutent y al Sorafenib

Las HUVEC fueron cultivadas o/n (toda la noche) en placas recubiertas con vitronectina, e incubadas con diferentes concentraciones de Sutent o Sorafenib durante 6h a 48h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se analizaron para IL-8 mediante Luminex. A) Regulación de IL-8 en respuesta a Sutent. B) Regulación de IL-8 en respuesta al Sorafenib (Figura 12).

35 **Ejemplo 12:**

DI-17E6 inhibe la angiogénesis en ensayo con plugs de Matrigel en monos

40 Inhibición de la angiogénesis en ensayo con plugs de Matrigel en monos mediante DI-17E6. La angiogénesis fue inducida en implantes de Matrigel subcutáneos que contienen 5 µg/mL de bFGF en monos Cynomolgus. El DI-17E6 fue proporcionado como una única infusión a 100, 30, 10, o 3 mg/kg. Después de 6 días, la angiogénesis fue cuantificada midiendo el contenido de hemoglobina en los plugs de Matrigel. * representa un valor $p < 0,05$ y ** representa un valor $p < 0,01$ (Figura 13).

Ejemplo 13:

Regulación de CRP y de IL-6 en plasma en respuesta al tratamiento con DI-17E6

Se implantó en monos *Cynomolgus* bFGF que contenían plugs de Matrigel y diferentes concentraciones de DI-17E6 durante 6 días. El plasma se recogió y analizó para CRP y para IL-6 mediante Luminex. A) Regulación de CRP. B) Regulación de IL-6 (Figura 14).

Ejemplo 14:

- 5 Regulación del ligando CD40 y de MMP9 en respuesta al tratamiento con DI-17E6

A) Se implantó en monos *Cynomolgus* bFGF que contenían plugs de Matrigel y diferentes concentraciones de DI-17E6 durante 6 días. El plasma se recogió y analizó para el ligando CD40 y MMP9 mediante Luminex. A) Regulación del ligando CD40. B) Regulación de MMP9 (Figura 15).

Ejemplo 15:

- 10 Inhibición de las vías de señalización específicas a integrina:

Además de la estimulación del factor de crecimiento, la adhesión mediada por integrina a la matriz extracelular es importante para promover la proliferación, supervivencia y migración celular. Después del ligamiento de la integrina, un amplio rango de eventos de señalización intracelular son inducidos, incluyendo la activación de Ras, MAPK, FAK, Src, Rac/Rho/cdc42 GTPasas. Para mantener la supervivencia de las células durante la angiogénesis, se requieren las integrinas alfa (V) beta (3) / (5) junto con FAK para una activación sostenida de la cascada MAPK (es decir ERK1/2). En este estudio se ha analizado el efecto de los dos inhibidores de la integrina, DI-17E6 y cilengitide, sobre las vías de señalización mediadas por integrina en las células endoteliales. Para este propósito, las células endoteliales de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se colocaron en placas sobre vitronectina para activar integrina alfa (V) beta (3), y a continuación se trataron con medio de cultivo o diferentes concentraciones de DI-17E6 o cilengitide. Después de 24h de tratamiento, los lisados celulares se prepararon y analizaron mediante análisis de Western Blot. Los efectos sobre las vías de señalización fueron evaluados comparando el ratio de niveles fosforilados con los niveles totales de la molécula de señalización respectiva, para explicar los efectos potenciales que surgen del desprendimiento celular. Como puede verse, el DI-17E6 en concentraciones que se sitúan en un rango desde 0,01 µg/mL a 10 µg/mL y el cilengitide en concentraciones que se sitúan en un rango desde 0,01 µM a 10 µM bloquearon la activación de FAK y ERK1/2 de forma dependiente de la dosis (Figura 16).

REIVINDICACIONES

1. Método *ex vivo* para la medición del efecto de un inhibidor de la integrina alfa (v) sobre la angiogénesis, en donde el inhibidor de la integrina es mAb DI-17E6 o el péptido RGD cilengitide, y/o la eficacia terapéutica de un inhibidor de ese tipo contra una enfermedad asociada a la angiogénesis, mediante al menos un gen biomarcador específico o un producto génico del mismo seleccionado del grupo que consiste en ADAMTS1, STC1, EDN1, MCP1, IL8, PDGF-BB, CRP, ligando CD40, e IL6, en donde, (i) debido a la administración del respectivo inhibidor de la integrina, ADAMTS1 y STC1 son incrementados de manera regulada y MCP1, EDN1 y PDGF-BB son reducidos de manera regulada, (ii) debido a la administración del cilengitide IL-8 es reducida de manera regulada; y (iii) debido a la administración de DI-17E6, IL8, IL6 y CRP son incrementados de manera regulada, y el ligando CD40 es reducido de manera regulada;

donde el método comprende las siguientes etapas:

(a) medir mediante medios y/o dispositivos técnicos la concentración de referencia y/o el estado de modificación de dicho biomarcador seleccionado en una muestra de un fluido corporal o tejido, mediante el cual se obtiene la muestra de un individuo que no ha sido tratado con dicho inhibidor;

(b) medir mediante medios y/o dispositivos técnicos la concentración y/o el estado de modificación de dichos biomarcadores seleccionados en una muestra de (a) obtenida de un individuo que ha sido tratado con dicho inhibidor o en una muestra de (a) que es tratada en una etapa posterior con dicho inhibidor.

(c) medir mediante medios y/o dispositivos técnicos las diferencias entre las concentraciones y/o el estado de modificación de los biomarcadores seleccionados obtenidos mediante la etapa (a) y (b);

(d) determinar a partir de dichas diferencias obtenidas de la etapa (c) una o más de las siguientes propiedades o parámetros de los inhibidores:

-- efectos farmacodinámicos sobre la diana molecular y sobre las respectivas vías de señalización ligadas a la diana molecular,

-- el efecto sobre la angiogénesis,

-- la eficacia del tratamiento y el resultado clínico en un paciente con una enfermedad asociada a la angiogénesis, y de manera opcional

(e) repetir las etapas (a) a (d) hasta que se obtengan las propiedades / parámetros deseados,

permitiendo, de ese modo, la evaluación de las medidas clínicas y actividades con respecto al efecto sobre la angiogénesis o la eficacia terapéutica, seguridad, pronóstico o dosificación de dicho inhibidor, o enfermedades relacionadas con la angiogénesis en un individuo.

2. Método *ex vivo* según la reivindicación 1, en donde la muestra tomada de fluido corporal es sangre, plasma, suero, linfa, orinal, lágrimas, líquido sinovial, exudado de heridas y/o líquido cefalorraquídeo.

3. Método según la reivindicación 1, en donde la muestra de tejido comprende un tejido enfermo o sano.

4. Método según la reivindicación 1, en donde la muestra de tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido cancerígeno, tejido de la piel y/o tejido sinovial.

5. Método *ex vivo* según la reivindicación 1, en donde se preparan células endoteliales a partir de la muestra de tejido tomada.

6. Método según la reivindicación 5, en donde las células endoteliales se cultivan bajo condiciones de laboratorio después de que han sido obtenidas de un individuo y preparadas a partir de una muestra de tejido, en donde al menos un biomarcador se determina a partir del medio de cultivo celular o extracto de dichas células.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 6, en donde la muestra de células endoteliales y/o fluidos corporales se derivan de un individuo sano y/o enfermo que sufre de un trastorno tumoral y/o otra enfermedad asociada a la angiogénesis.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7, en donde la enfermedad asociada a la angiogénesis es cáncer o una enfermedad relacionada con el cáncer.

- 5 9. Uso de un gen biomarcador o su producto génico seleccionado del grupo que consiste en ADAMTS1, STC1, EDN1, MCP1, IL8, PDGF-BB, CRP, ligando CD40 e IL6 para evaluar y predecir el efecto del inhibidor de la integrina alfa (v) mAb DI-17E6 o el péptido RGD cilengitide, sobre la angiogénesis en un ensayo basado en células, o la eficacia y / o la dosificación de un inhibidor de ese tipo ex vivo, en donde, (i) debido a la administración del respectivo inhibidor de integrina, ADAMTS1 y STC1 son incrementados de manera regulada, y MCP1, EDN1 y PDGF-BB son reducidos de manera regulada, (ii) debido a la administración de cilengitide, IL8 es reducida de manera regulada; y (iii) debido a la administración de DI-17E6, IL8, IL6 y CRP son incrementados de manera regulada, y el ligando CD40 es reducido de manera regulada.

Figura 1

A)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLAWYQOKPGKAPKLLIYYTSKIHSGVPSRFS
GS GSGTDYTFTISSLOPEDIAITYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH
 KKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

B)

QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHWRQAPGQGLEWIGYINP
RS GYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFLGRGAMDY
WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDKTV
EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV
 NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK

Figura 2:

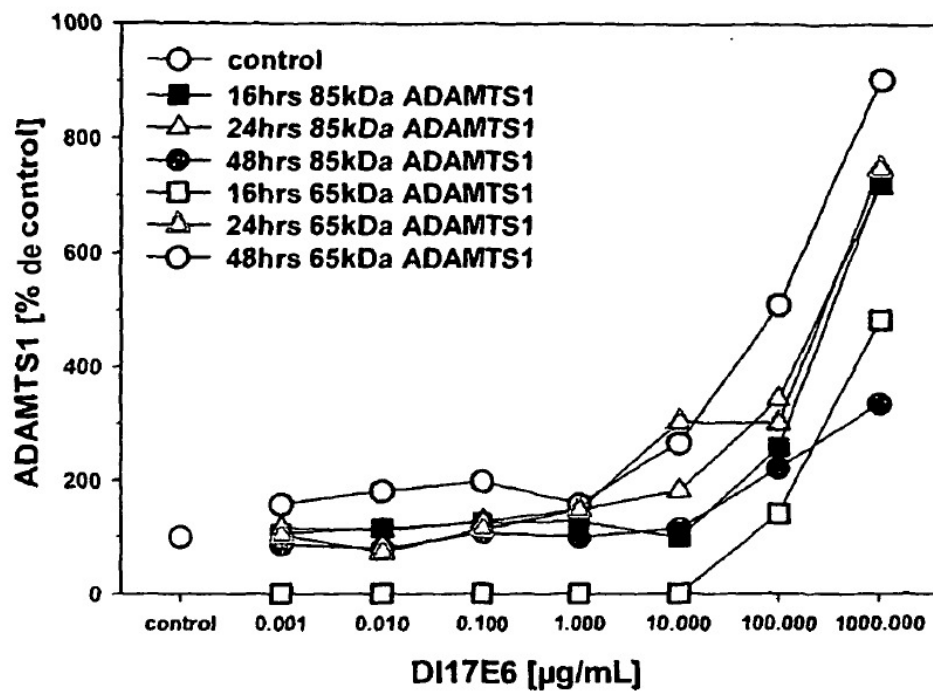


Figura 3:

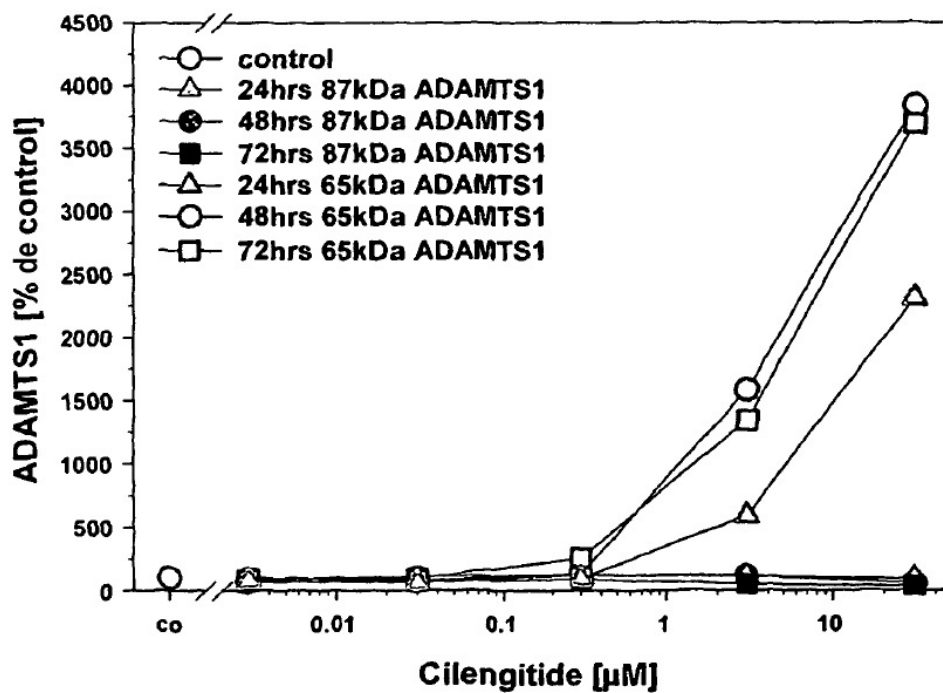
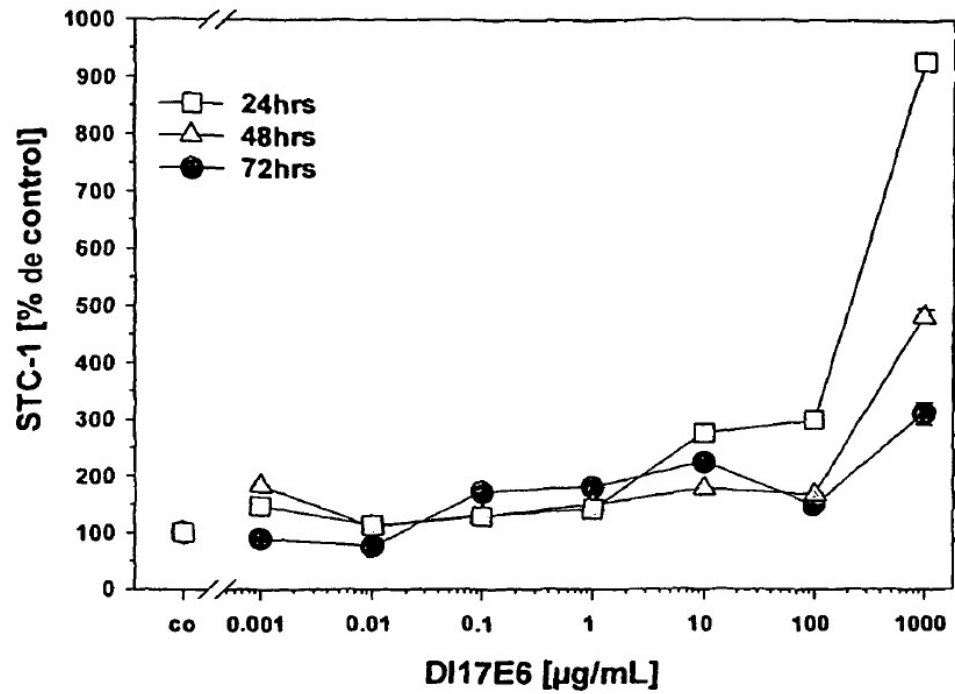


Figura 4:

A)



B)

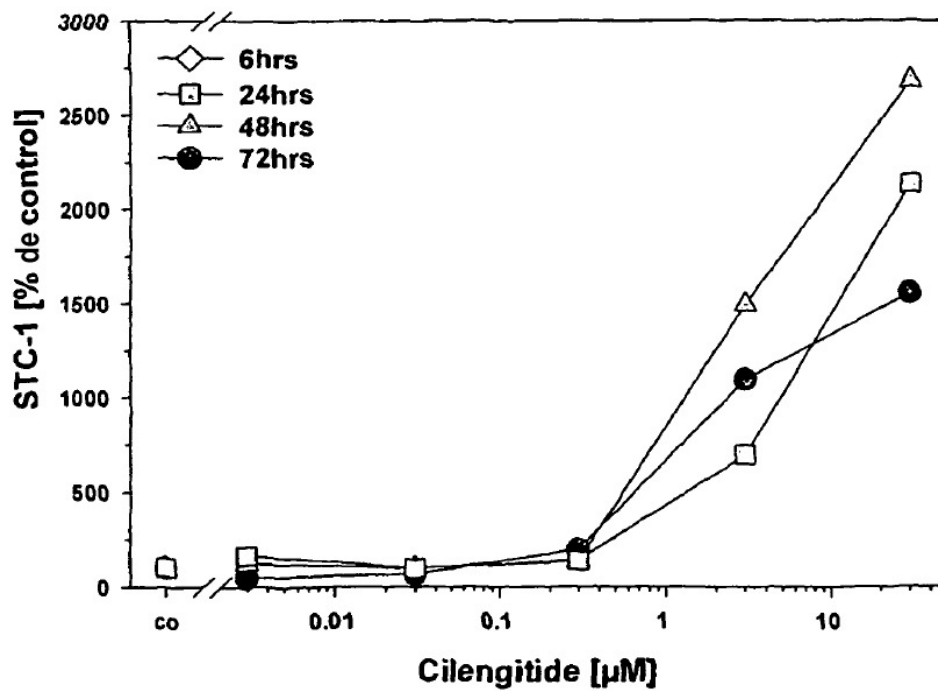
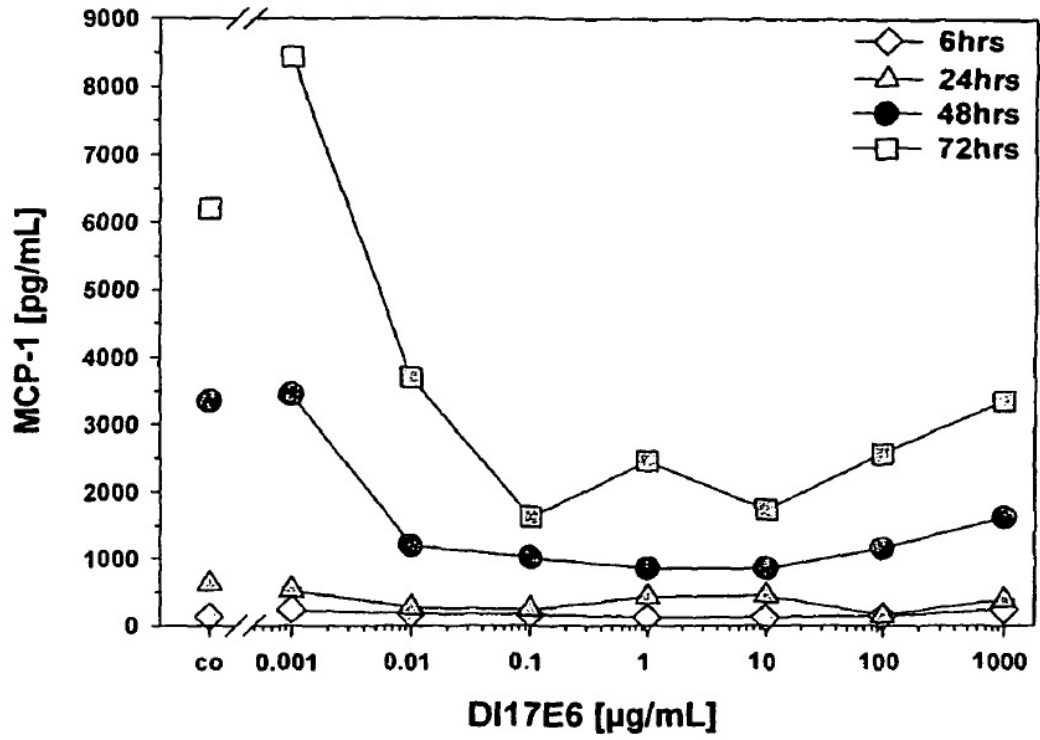


Figura 5:

A)



B)

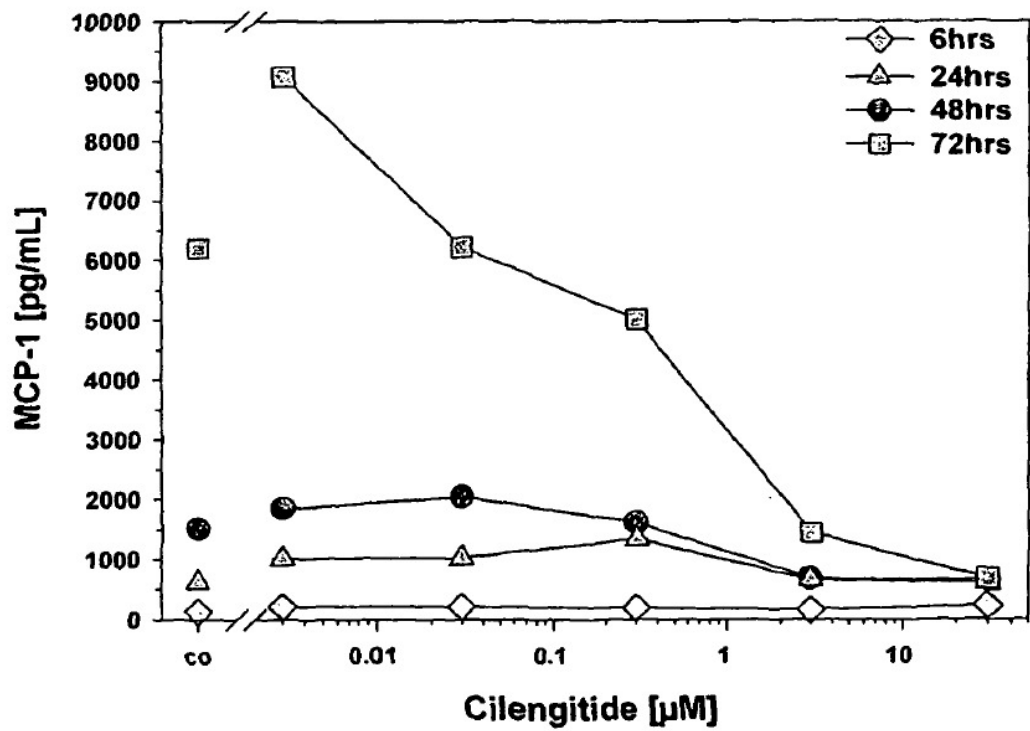
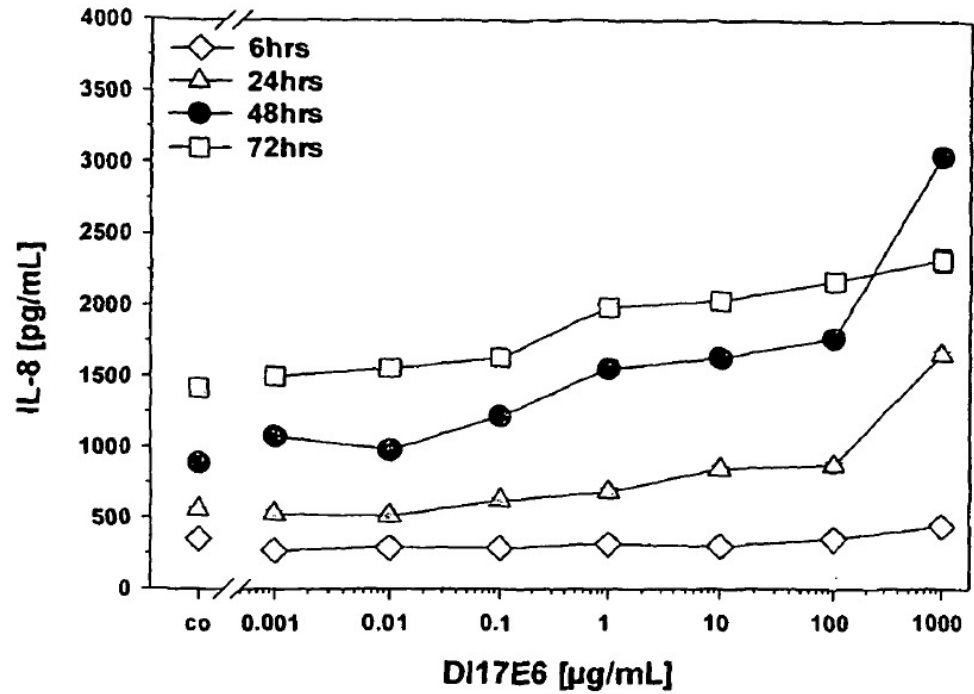


Figura 6:

A)



B)

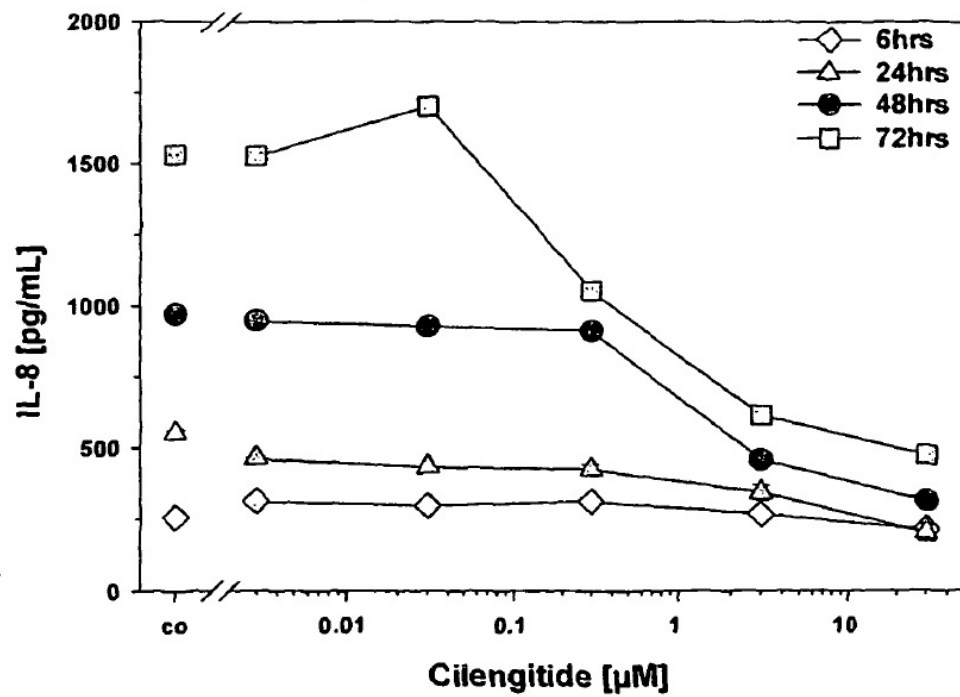
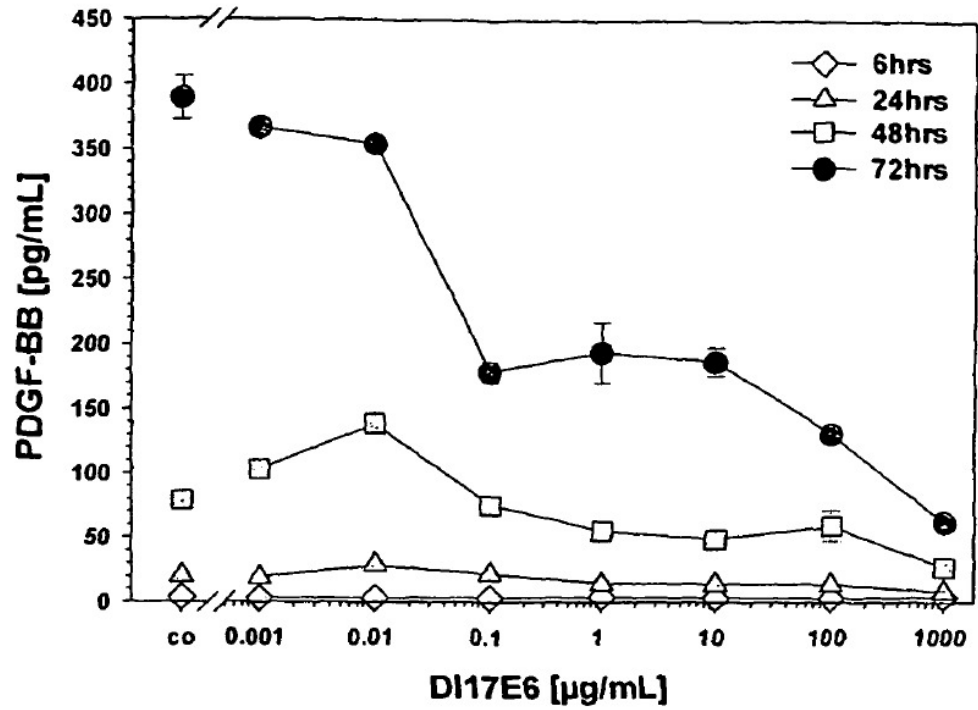


Figura 7:

A)



B)

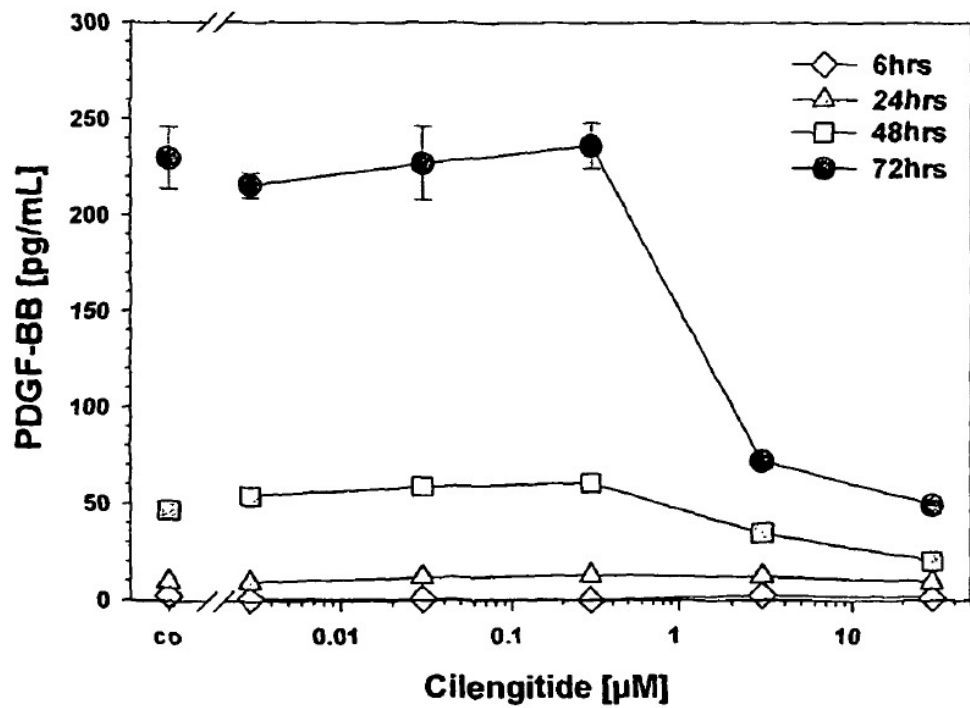
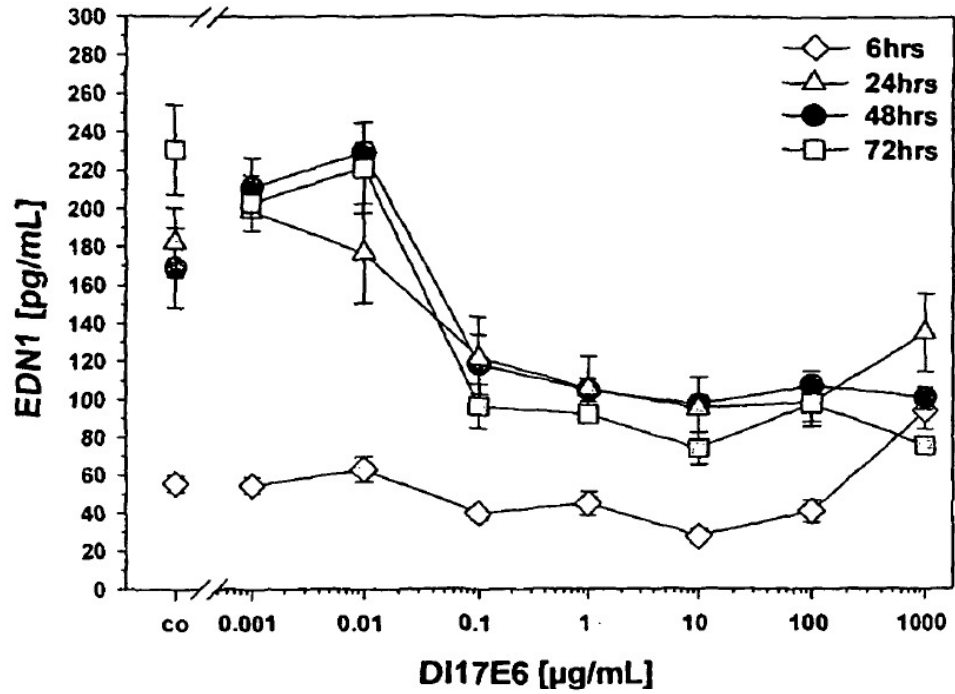


Figura 8:

A)



B)

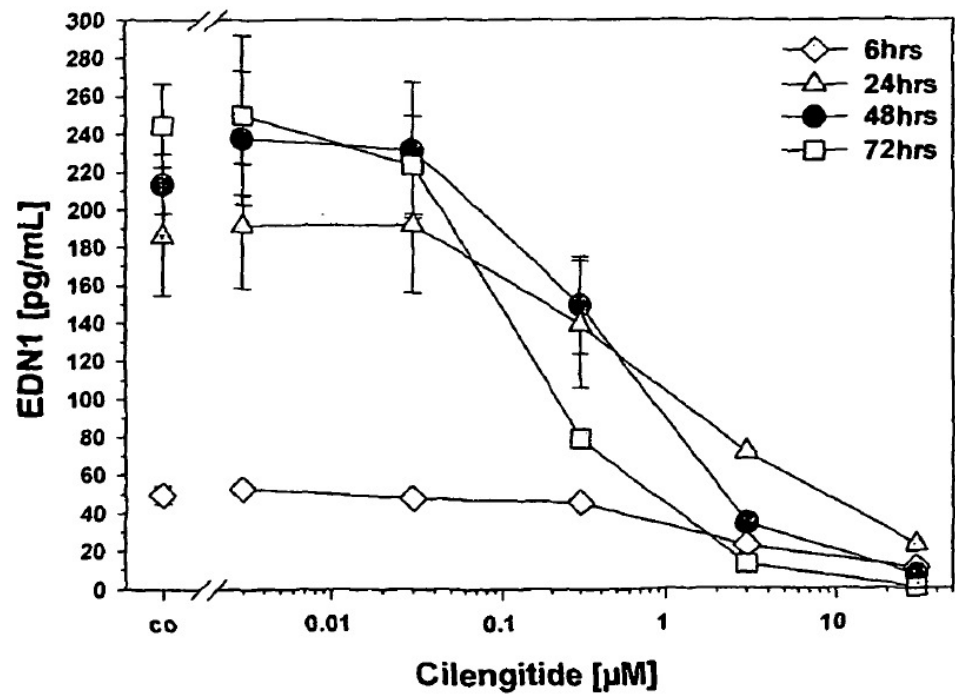
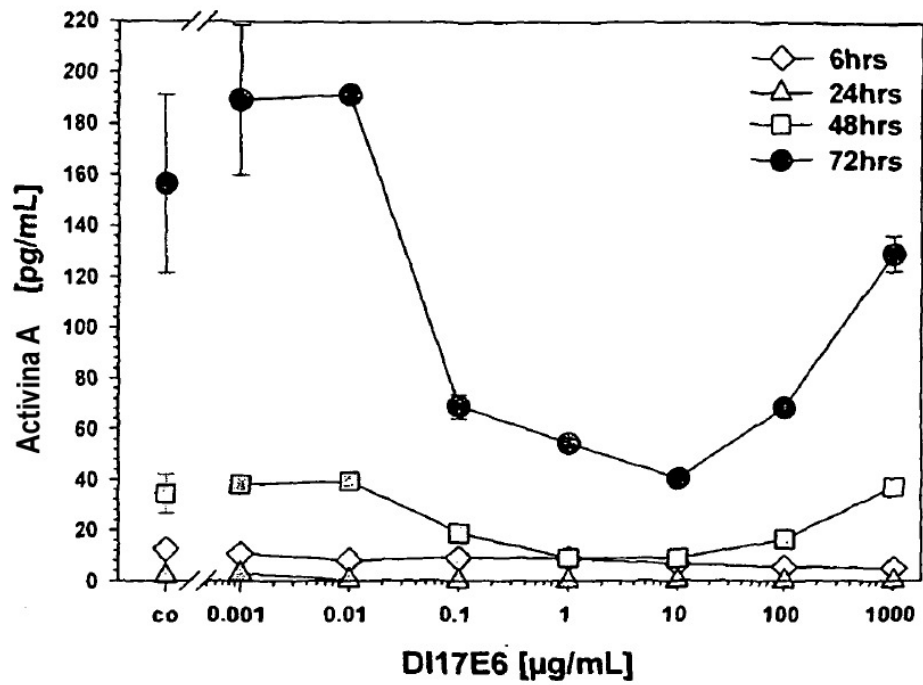


Figura 9:

A)



B)

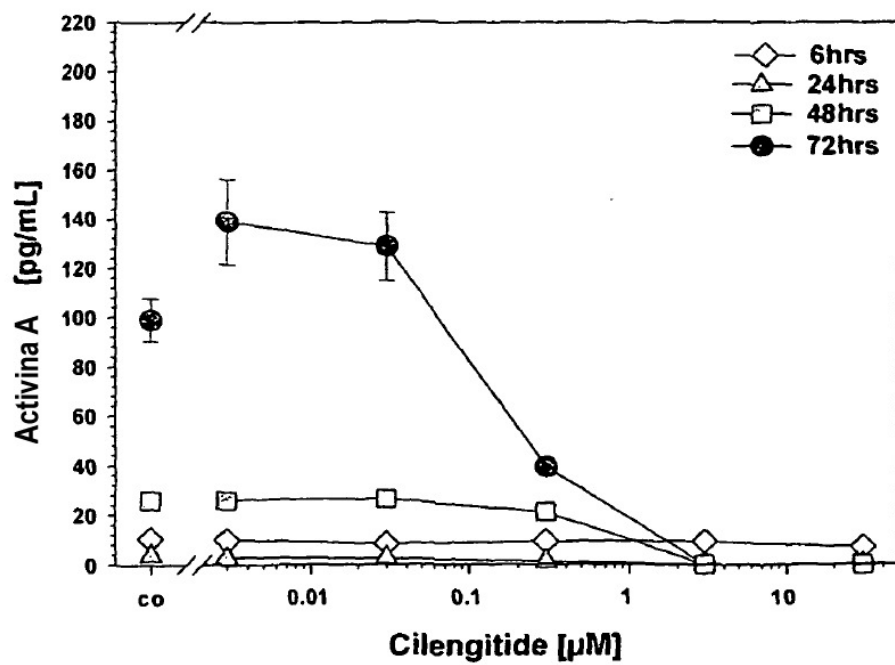
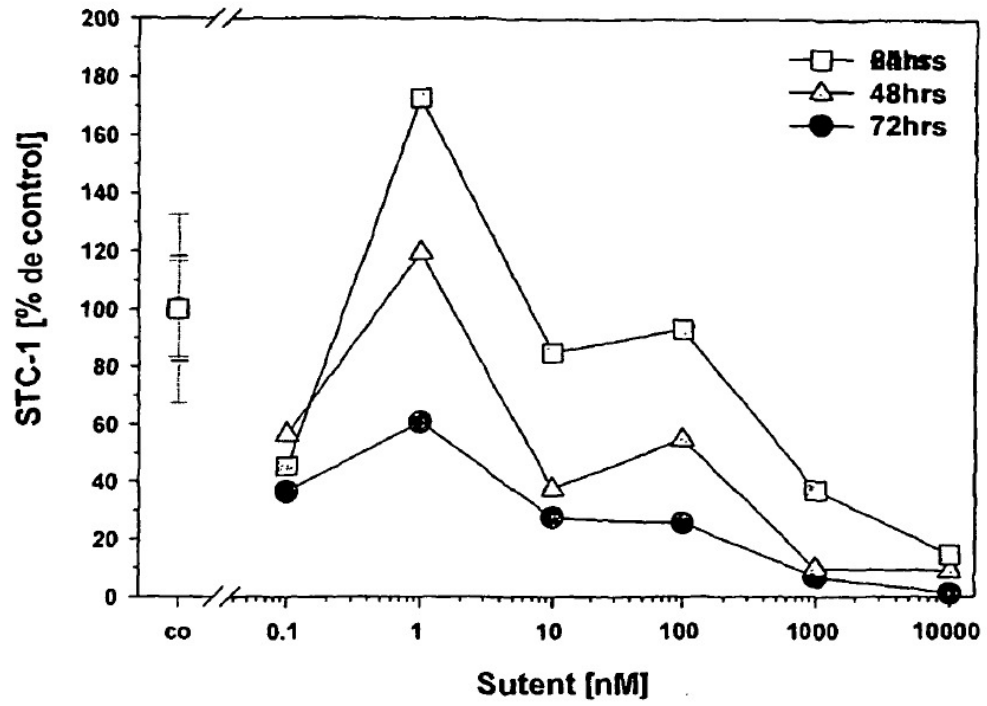


Figura 10:

A)



B)

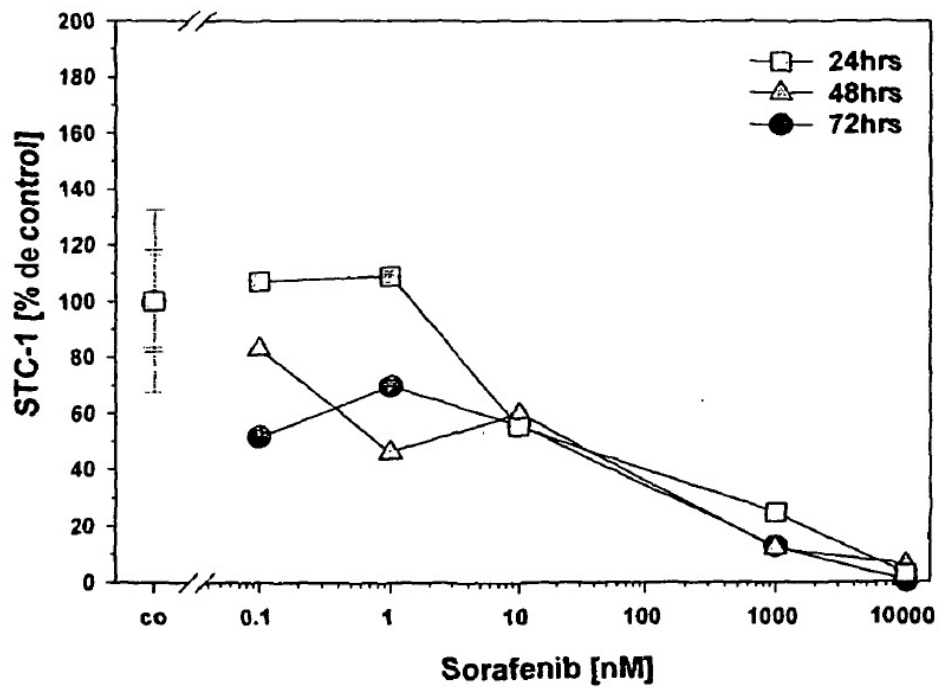
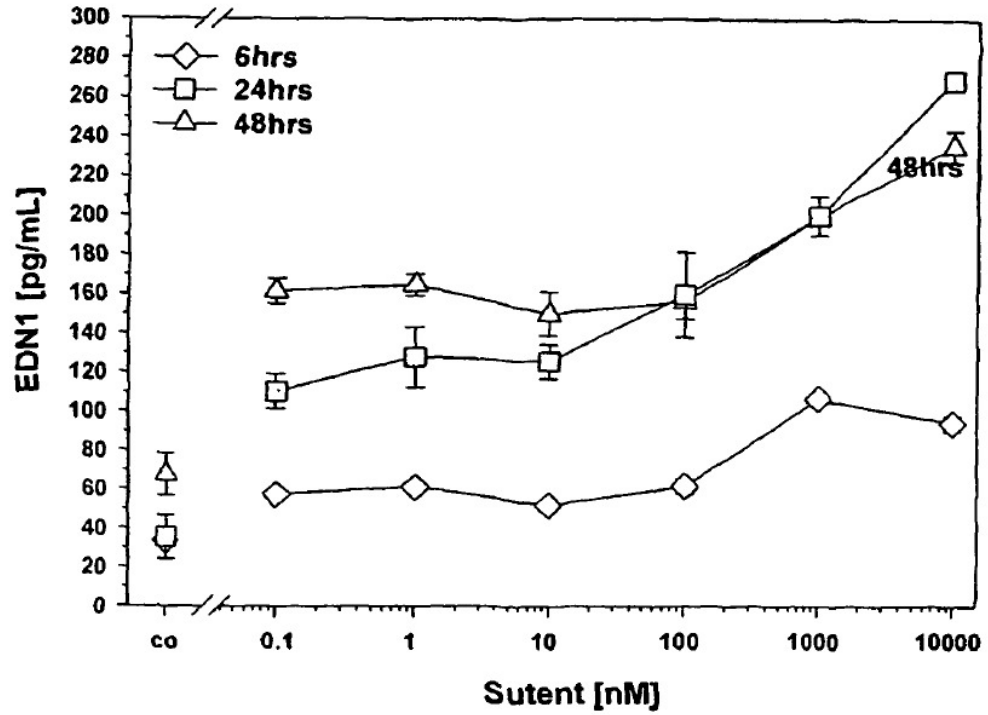


Figura 11:

A)



B)

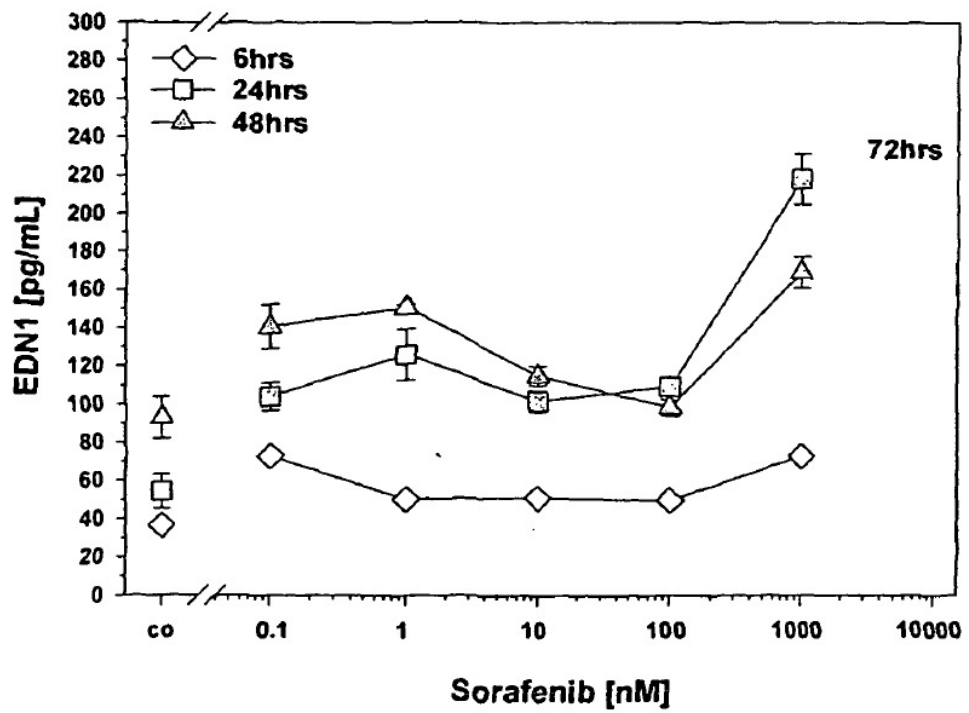
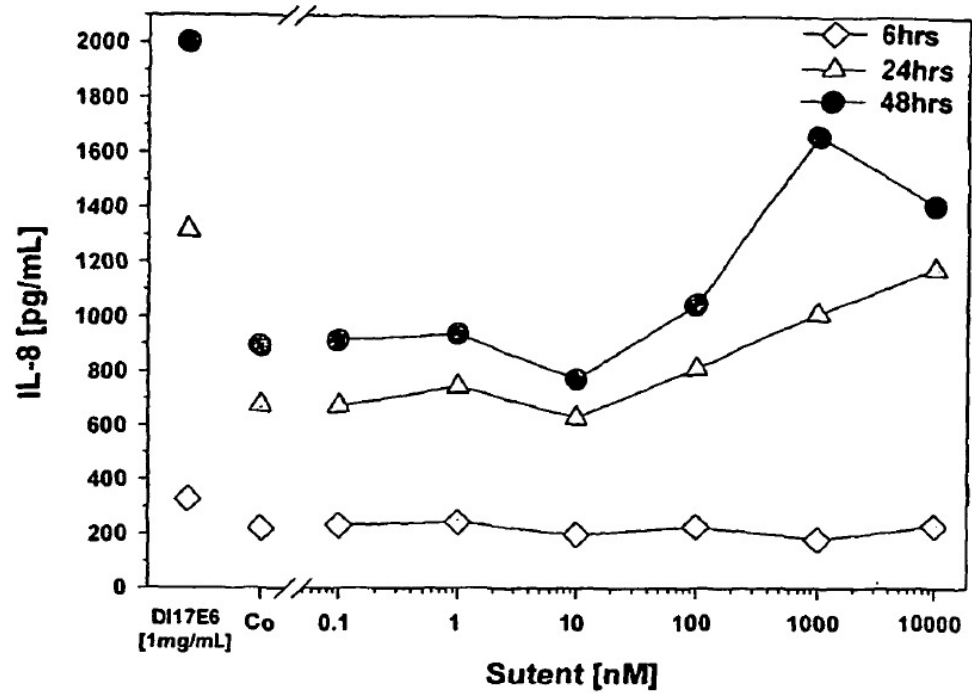


Figura 12:

A)



B)

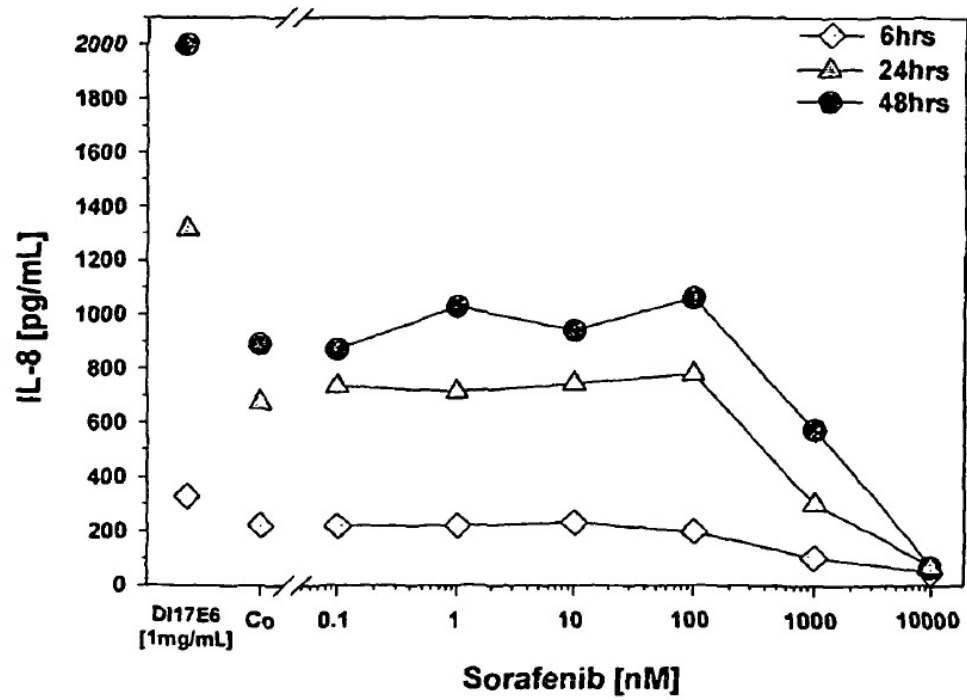


Figura 13:

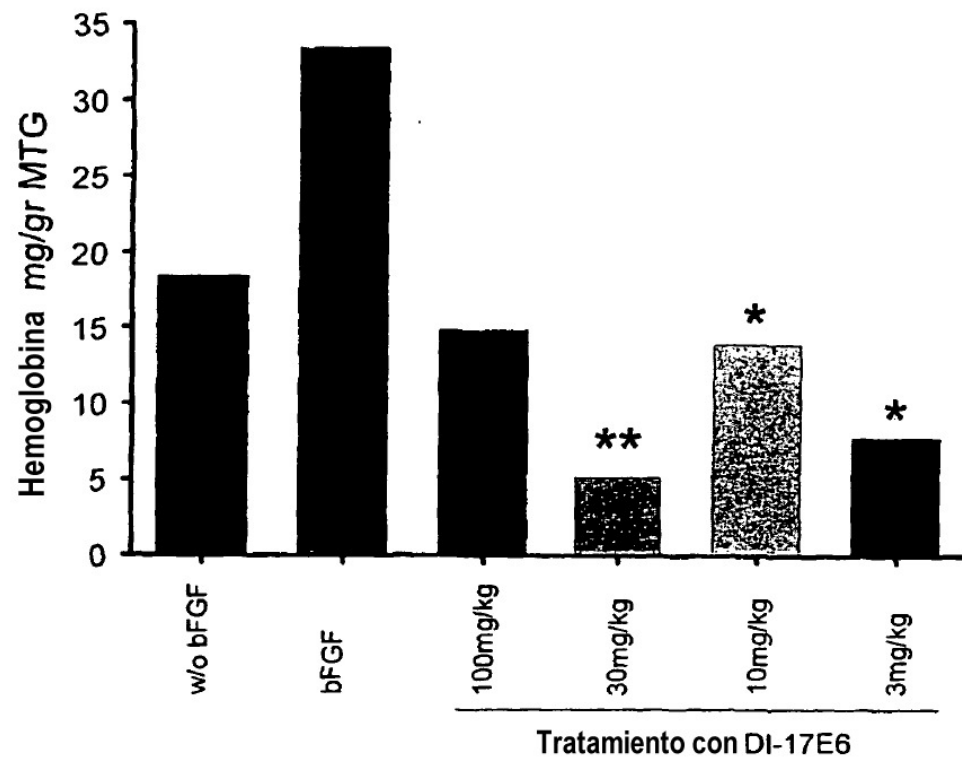
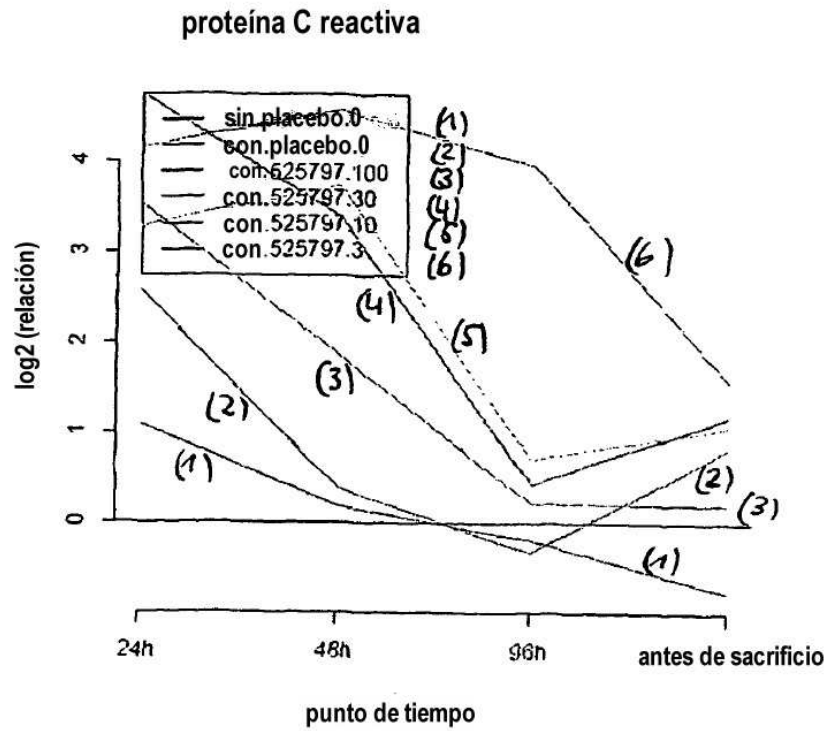


Figura 14:

A)



B)

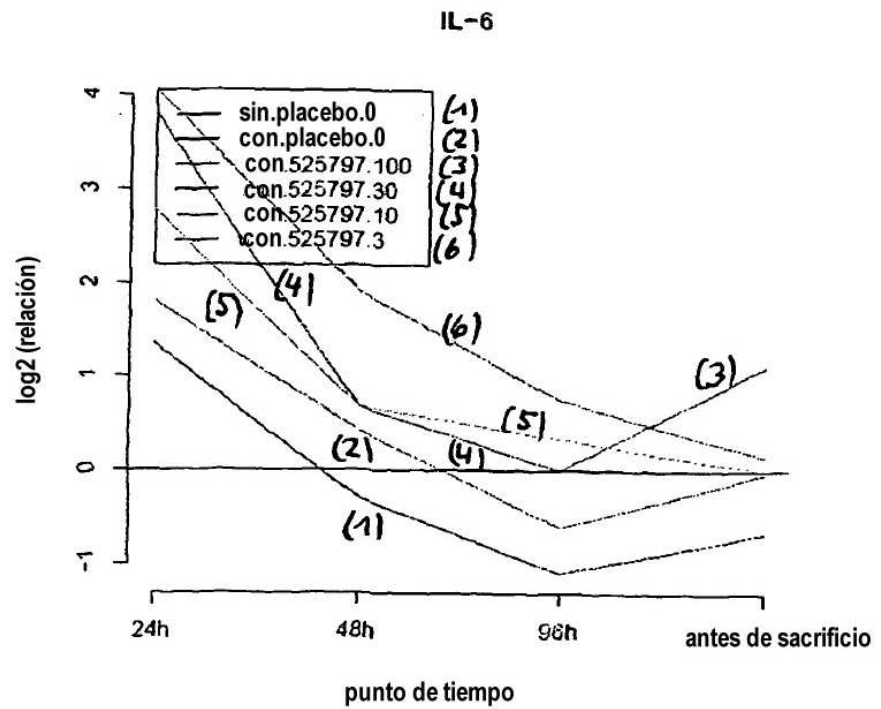
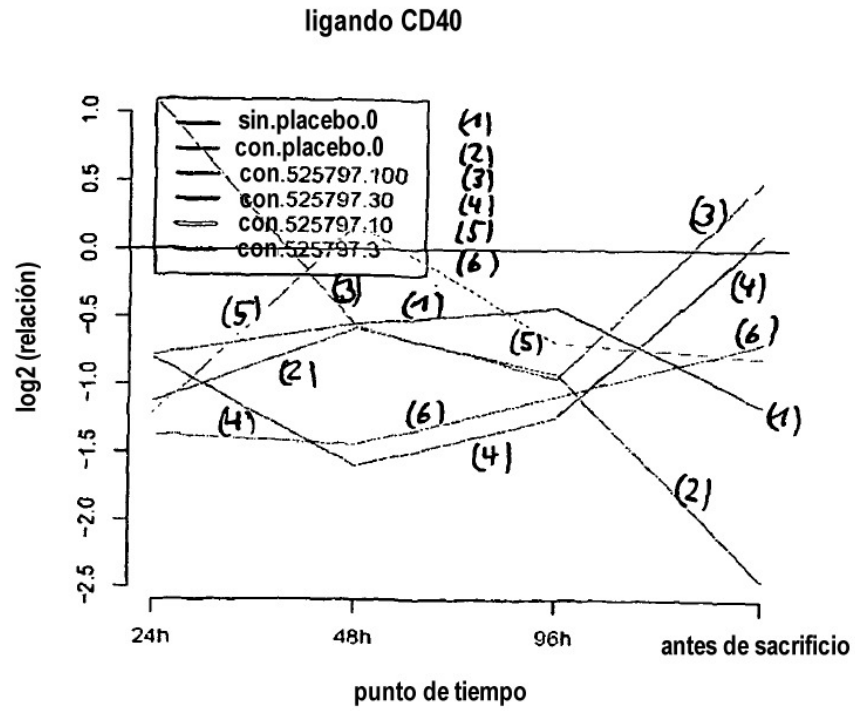


Figura 15:

A)



B)

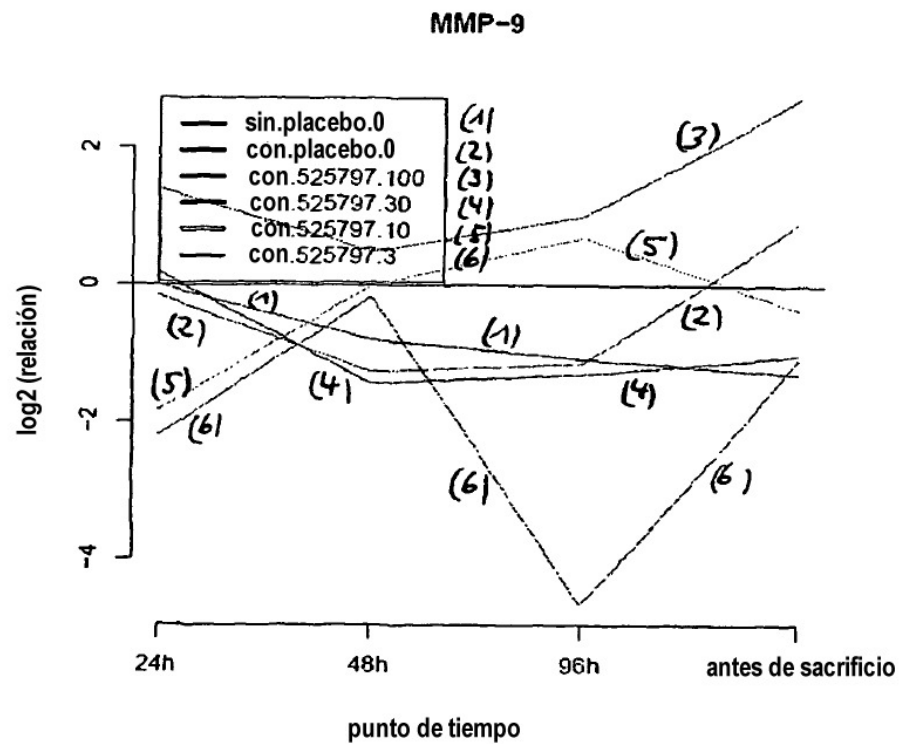


Figura 16:

