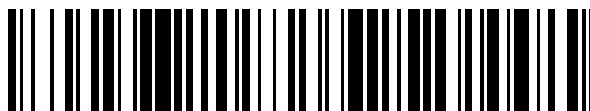


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 404**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2009 E 09764134 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2361085**

54 Título: **Uso de anticuerpo anti-VEGF en combinación con quimioterapia para tratar cáncer de mama**

30 Prioridad:

22.11.2008 US 117102 P
13.05.2009 US 178009 P
18.05.2009 US 179307 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

FYFE, GWENDOLYN;
PHAN, SEE CHUN y
ZHOU, XIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 404 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

Uso de anticuerpo anti-VEGF en combinación con quimioterapia para tratar cáncer de mama

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere en general al tratamiento de enfermedades humanas y afecciones patológicas. Más específicamente, la invención se refiere a la terapia antiangiogénica, sola o en combinación con otras terapias anticancerosas, para el tratamiento de cáncer de mama.

10 ANTECEDENTES

El cáncer sigue siendo una de las amenazas más mortales para la salud humana. En los EE.UU., el cáncer afecta a casi 1,3 millones de pacientes nuevos cada año, y es la segunda causa principal de muerte después de las enfermedades cardíacas, dando cuenta de aproximadamente 1 de cada 4 muertes. El cáncer de mama es la segunda forma más común de cáncer y la segunda causa principal de mortalidad por cáncer entre las mujeres estadounidenses.

Se ha predicho también que el cáncer puede superar a las enfermedades cardiovasculares como causa número uno de muerte en 5 años. Los tumores sólidos son responsables de la mayoría de esas muertes. Aunque ha habido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos cánceres, la tasa de supervivencia global a los 5 años para todos los cánceres ha mejorado solo aproximadamente un 10 % en los últimos 20 años. Los cánceres, o tumores malignos, se metastatizan y crecen rápidamente de manera descontrolada, haciendo extremadamente difícil la detección y tratamiento a tiempo.

El cáncer de mama es una enfermedad que mata muchas mujeres cada año en los Estados Unidos. Según la American Cancer Society, aproximadamente 40.000 mujeres morirán por esta enfermedad en 2008. Se diagnostican más de 180.000 nuevos casos de cáncer de mama anualmente, y se estima que una de cada ocho mujeres desarrollará cáncer de mama. Estos números indican que el cáncer de mama es una de las enfermedades más peligrosas a que se enfrentan las mujeres actualmente.

El cáncer de mama metastásico es generalmente incurable, consiguiendo solo unas pocas pacientes la supervivencia a largo plazo después de quimioterapia estándar. Greenberg *et al.*, J. Clin. Oncol. 14: 2197-2205 (1996).

Los conocimientos de la biología básica del cáncer de mama se han ampliado exponencialmente durante las últimas tres décadas, teniendo algunos impacto sobre la terapia. Un ensayo de fase II abierto multinacional de 222 mujeres con cáncer de mama metastásico que sobreexpresa HER2 encontró una tasa de respuesta del 15 % con seis remisiones completas confirmadas usando un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (trastuzumab, también conocido como Herceptin®, Genentech, South San Francisco) dirigido contra HER2 (Cobleigh *et al.*, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 17: 97 (1998)). Un ensayo de fase III aleatorizado evaluó la seguridad y eficacia de añadir Herceptin a quimioterapia de primera línea con paclitaxel o la combinación de doxorubicina más ciclofosfamida. La tasa de respuesta total y el tiempo hasta la progresión mejoraron significativamente con la adición de Herceptin a la quimioterapia en comparación con quimioterapia sola (Slamon *et al.*, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 17: 98 (1998)). De forma más importante, la adición de Herceptin prolongó la supervivencia global (Norton *et al.*, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 18:127a (1999)).

Aunque el trastuzumab es el primer agente terapéutico de base biológica novedoso aprobado para el tratamiento de una subpoblación de pacientes de cáncer que tienen cánceres que sobreexpresan HER2, varios otros enfoques se han mostrado prometedores y han entrado en el uso clínico. Hay estimaciones de que el 75 % de las mujeres con cáncer de mama metastásico recién diagnosticado son negativas de HER2. Los compuestos que inhiben la angiogénesis han generado un interés particular para llegar a poblaciones de cáncer de mama adicionales y han sido y son el objeto de ensayos clínicos tanto en los EE.UU. como en el extranjero.

La angiogénesis es un evento celular importante en que las células endoteliales vasculares proliferan, se recortan y reorganizan, formando nuevos vasos a partir de la red vascular preexistente. Existen evidencias convincentes de que el desarrollo de un suministro vascular es esencial para procesos proliferativos normales y patológicos (Folkman y Klagsbrun, Science 235: 442-447(1987)). El suministro de oxígeno y nutrientes, así como la retirada de productos catabólicos, representan etapas limitantes de la velocidad en la mayoría de procesos de crecimiento que aparecen en organismos multicelulares.

Aunque la inducción de nuevos vasos sanguíneos se considera que es el modo predominante de angiogénesis tumoral, datos recientes han indicado que algunos tumores pueden crecer apropiándose de vasos sanguíneos existentes del hospedador. Los vasos apropiados retroceden entonces, conduciendo a la regresión del tumor que se revierte eventualmente mediante angiogénesis inducida por hipoxia en el margen tumoral. Holash *et al.* Science 284: 1994-1998 (1999).

Uno de los reguladores positivos clave de la angiogénesis tanto normal como anormal es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF en inglés)-A. El VEGF-A es parte de una familia génica que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF. El VEGF-A se une principalmente a dos receptores tirosina cinasas de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), siendo la última el transmisor principal de señales mitogénicas de VEGF-A en células endoteliales vasculares. Adicionalmente, la neuropilina 1 se ha identificado como un receptor para isoformas de VEGF-A de unión a heparina, y puede desempeñar un papel en el desarrollo vascular.

Además de ser un factor angiogénico en angiogénesis y vasculogénesis, el VEGF, como factor de crecimiento pleiotrópico, exhibe múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos, tales como supervivencia de células endoteliales, permeabilidad y vasodilatación de vasos, quimiotactismo de monocitos y flujo de entrada de calcio. Ferrara y Davis-Smyth (1997), *supra*. Además, hay estudios que han reseñado efectos mitogénicos del VEGF sobre unos pocos tipos de células no endoteliales, tales como células epiteliales de pigmento retiniano, células de conducto pancreático y células de Schwann. Guerrin *et al.* J. Cell Physiol. 164: 385-394 (1995); Oberg-Welsh *et al.* Mol. Cell. Endocrinol. 126: 125-132 (1997); Sondell *et al.* J. Neurosci. 19: 5731-5740 (1999).

El reconocimiento de VEGF como regulador primario de la angiogénesis en afecciones patológicas ha conducido a numerosos intentos de bloquear las actividades de VEGF en afecciones que implican una angiogénesis patológica. La expresión de VEGF está regulada positivamente en la mayoría de malignidades y la sobreexpresión de VEGF se correlaciona con una etapa más avanzada o un peor pronóstico en muchos tumores sólidos. Por lo tanto, las moléculas que inhiben las rutas de señalización de VEGF se han usado para el tratamiento de tumores sólidos relativamente avanzados en que se observa angiogénesis patológica.

Heinemann V. "EJC SUPPLEMENTS", vol.6, n° 8, páginas 13-18; Cameron D *et al.*, "EJC SUPPLEMENTS, vol. 6, n° 6, páginas 40-50; "ClinicalTrials.gov", número de ensayo NCT00262067 y O'Shaughnessy y Brufsky, (2008), Clinical Breast Cancer, 8(4): 370-373 describen el ensayo clínico RIBBON 1 relacionado con la presente invención, pero no contienen resultados.

Puesto que el cáncer es aún una de las amenazas más mortales, son necesarios tratamientos de cáncer adicionales para pacientes. Específicamente, son necesarios tratamientos para pacientes con CMM para mejorar el control de la enfermedad y para prevenir síntomas minimizando la toxicidad. La invención se dirige a estas y otras necesidades, como resultará evidente tras la revisión de la siguiente divulgación.

SUMARIO

La invención se refiere al uso de anticuerpo anti-VEGF para tratar eficazmente en pacientes de cáncer de mama un cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado. En particular, la invención proporciona datos de un ensayo clínico de fase III aleatorizado de bevacizumab (AVASTIN®) en combinación con regímenes quimioterapéuticos en sujetos con cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado en sujetos humanos. Dichos regímenes quimioterapéuticos incluyen terapia con antraciclinas (p.ej., doxorubicina, epirubicina o combinaciones de las mismas). En algunas realizaciones, el tratamiento se usa como terapia de primera línea para cáncer de mama metastásico localmente recurrente o anteriormente no tratado. El éxito del ensayo muestra que añadir anticuerpo anti-VEGF a una quimioterapia estándar proporciona beneficios estadísticamente significativos y clínicamente relevantes para pacientes de cáncer de mama. Además, la seguridad era consistente con los resultados de los ensayos de bevacizumab anteriores.

Los resultados obtenidos en estudios clínicos del uso de bevacizumab en sujetos humanos con cáncer de mama metastásico muestran que la eficacia, evaluada por la supervivencia libre de progresión (SLP), era positiva especialmente cuando se comparaba con los datos de SLP para agentes quimioterapéuticos solos. Los sujetos en los ensayos clínicos que recibieron bevacizumab en combinación con terapia de taxano (p.ej., docetaxel o partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®))/terapia con antraciclina (p.ej., doxorubicina, epirubicina o combinaciones de las mismas) tenían un aumento de la supervivencia libre de progresión en comparación con sujetos tratados con terapia de taxano (p.ej., docetaxel o partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®))/terapia con antraciclina (p.ej., doxorubicina, epirubicina o combinaciones de las mismas) sola. Los sujetos en los ensayos clínicos que recibieron bevacizumab en combinación con terapia de capecitabina como se describe a continuación tuvieron un aumento de la supervivencia libre de progresión en comparación con sujetos tratados con terapia de capecitabina sola. La diferencia era significativa.

En consecuencia, se proporcionan en la presente memoria procedimientos de tratamiento de un sujeto diagnosticado con cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado, que comprenden administrar al sujeto un régimen de tratamiento que comprende una cantidad eficaz de al menos una quimioterapia y un anticuerpo anti-VEGF, en los que dicho sujeto no ha recibido ninguna quimioterapia por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. Opcionalmente, el sujeto es negativo de HER2. En algunas realizaciones, el sujeto es positivo de HER2. Opcionalmente, el sujeto no ha recibido quimioterapia complementaria anterior por recurrencia en 12 meses o menos desde la última dosis. El régimen de tratamiento que combina quimioterapia y administración de anti-VEGF alarga eficazmente la supervivencia libre de progresión (SLP) del sujeto. En ciertas realizaciones, el régimen de

tratamiento que combina quimioterapia y anticuerpo anti-VEGF tiene un perfil de seguridad que es consistente con los resultados de los ensayos anteriores de bevacizumab.

Se proporcionan además en la presente memoria usos de un anticuerpo anti-VEGF con al menos un agente quimioterapéutico en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer de mama metastásico no tratado anteriormente en un sujeto, en los que dicho sujeto no ha recibido ninguna quimioterapia por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. Opcionalmente, el sujeto es negativo de HER2. En algunas realizaciones, el sujeto es positivo de HER2. Opcionalmente, el sujeto no ha recibido quimioterapia complementaria anterior por recurrencia en 12 meses o menos desde la última dosis. El uso de anti-VEGF y agente quimioterapéutico alarga eficazmente la supervivencia libre de progresión (SLP) del sujeto. En ciertas realizaciones, el uso de quimioterapia y anticuerpo anti-VEGF tiene un perfil de seguridad que es consistente con los resultados de ensayos anteriores de bevacizumab.

Se proporcionan también en la presente memoria anticuerpos anti-VEGF para uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer de mama localmente recurrente o metastásico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto un régimen de tratamiento que comprende una cantidad eficaz de una quimioterapia y un anticuerpo anti-VEGF, en el que dicho sujeto no ha recibido ninguna quimioterapia por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. Opcionalmente, el sujeto es negativo de HER2. En algunas realizaciones, el sujeto es positivo de HER2. Opcionalmente, el sujeto no ha recibido quimioterapia complementaria anterior por recurrencia en 12 meses o menos desde la última dosis. El régimen de tratamiento que combina quimioterapia y administración de anti-VEGF alarga eficazmente la supervivencia libre de progresión (SLP) del sujeto. En ciertas realizaciones, el régimen de tratamiento que combina quimioterapia y anticuerpo anti-VEGF tiene un perfil de seguridad que es consistente con los resultados de los ensayos de bevacizumab anteriores.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, la SLP se alarga aproximadamente 1 mes, 1,2 meses, 2 meses, 2,4 meses, 2,9 meses, 3 meses, 3,5 meses, 4 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, etc. En una realización, la SLP se alarga de aproximadamente 2,9 a 3,5 meses (p.ej., con capecitabina). En una realización, la SLP se alarga de aproximadamente 1,2 meses a aproximadamente 2,4 meses (p.ej., con taxano/antraciclina).

Puede usarse cualquier agente quimioterapéutico que exhiba actividad anticancerosa según cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo consistente en agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides del vinca, epipodofilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida con antracenodiona, derivados de metilhidrazina, supresores corticoadrenales, adrenocorticoesteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógenos, andrógenos, antiandrógenos y análogos de hormona liberadora de gonadotropina. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es, por ejemplo, capecitabina, taxano, antraciclina, paclitaxel, docetaxel, partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®), doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida o combinaciones de los mismos. Pueden usarse dos o más agentes quimioterapéuticos (p.ej., en un cóctel) para administrar en combinación con la administración de anticuerpo anti-VEGF.

Pueden medirse los beneficios clínicos de cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria según la invención, por ejemplo, mediante la duración de la supervivencia libre de progresión (SLP), el tiempo hasta el fallo del tratamiento, la tasa de respuesta objetiva y la duración de la respuesta.

En cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, el anticuerpo anti-VEGF puede ser sustituido por un antagonista específico de VEGF, p.ej., una molécula receptora de VEGF o molécula receptora de VEGF quimérica como se describe en la presente memoria. En ciertas realizaciones de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. El anticuerpo anti-VEGF, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo totalmente humano o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos ejemplares usados en los procedimientos de la invención incluyen bevacizumab (AVASTIN®), un anticuerpo G6, un anticuerpo B20 y fragmentos de los mismos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia aminoacídica:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW

INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP

HYYGSSHWYF DVWGQGT LVT VSS (SEQ ID No. 1)

y una región variable de cadena ligera que comprende la siguiente secuencia aminoacídica:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF

TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ

GTKVEIKR (SEQ ID No. 2).

5

El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede ser también un anticuerpo que carece de la porción Fc, un F(ab')₂, un Fab, o una estructura de Fv.

10

En una realización de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, el tratamiento es una combinación de un antagonista específico de VEGF, p.ej., anticuerpo anti-VEGF, y al menos un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, el antagonista específico de VEGF es una monoterapia.

15

Cada uno de cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria puede practicarse con relación al tratamiento de cánceres que incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, carcinoma espinocelular, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer endométrico o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En algunas realizaciones de los procedimientos de la invención, el sujeto tiene cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, el sujeto tiene cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de mama metastásico negativo de HER2.

25

30

Cada uno de los aspectos anteriores puede incluir además la monitorización en el sujeto de la recurrencia del cáncer. La monitorización puede lograrse, por ejemplo, evaluando la supervivencia libre de progresión (SLP) o supervivencia global (SG) o tasa de respuesta objetiva (TRO). En una realización, se evalúan SLP o SG o TRO después del inicio del tratamiento.

35

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, se describen en la presente memoria las dosificaciones preferidas de anticuerpo anti-VEGF, p.ej., bevacizumab, y pueden oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo pero sin limitación 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg. La frecuencia de administración variará dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta que se trata el cáncer o se consigue el efecto terapéutico deseado, medido mediante los procedimientos descritos en la presente memoria o conocidos en la materia. En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF se administra una vez por semana, cada dos semanas o cada tres semanas, a un intervalo de dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo pero sin limitación 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. La progresión de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

40

45

En realizaciones adicionales de cada uno de los aspectos anteriores, el antagonista específico de VEGF, p.ej., anticuerpo anti-VEGF, se administra por vía local o sistémica (p.ej., por vía oral o intravenosa). En otras realizaciones, es un aspecto del tratamiento con el antagonista específico de VEGF en una monoterapia o una monoterapia durante el periodo de tratamiento con antagonista específico de VEGF, p.ej., en la fase de tratamiento prolongado o terapia de mantenimiento, como se valora por el personal sanitario o se describe en la presente memoria.

50

55

En otras realizaciones de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, el uso o composición con el antagonista específico de VEGF es en combinación con una terapia anticancerosa adicional incluyendo, pero sin limitación, cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia de diferenciación, bioterapia, inmunoterapia, un inhibidor de la angiogénesis, un agente citotóxico y/o un compuesto antiproliferativo. El tratamiento, uso y composición con el antagonista específico de VEGF puede incluir también cualquier combinación de los tipos anteriores de regímenes terapéuticos. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico y el antagonista específico de VEGF se administran al mismo tiempo.

En las realizaciones de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria que incluyen una terapia anticancerosa adicional, el sujeto puede tratarse además con la terapia anticancerosa adicional antes, durante (p.ej., simultáneamente) o después de la administración del antagonista específico de VEGF. En una realización, el antagonista específico de VEGF, administrado solo o con una terapia anticancerosa, puede administrarse como terapia de mantenimiento.

Resultarán evidentes otros rasgos y ventajas de la invención a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa el diseño de estudio del ensayo de cáncer de mama metastásico usando bevacizumab (BV) o placebo (PL) con diversas quimioterapias.

La Figura 2 representa las curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) para la rama de capecitabina del ensayo. INV (investigador) es SLP valorada por el investigador y CRI es SLP valorada por un comité de revisión independiente (CRI), en que placebo es PL y bevacizumab es BV.

La Figura 3 representa las curvas de SLP para la rama de taxano/antraciclina del ensayo. INV es SLP valorada por el investigador y CRI es SLP valorada por un comité de revisión independiente (CRI), en que placebo es PL y bevacizumab es BV.

La Figura 4 representa los análisis de subgrupo de SLP en los grupos de capecitabina y taxano/antraciclina del ensayo.

La Figura 5 representa la tasa de respuesta objetiva para los grupos de capecitabina (Cape) y taxano/antraciclina (T/Antra).

La Figura 6 representa los análisis de subgrupo de SLP para cohortes de taxano/antraciclina (T/Antra).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. DEFINICIONES

El término "VEGF" o "VEGF-A" se usa para hacer referencia al factor del crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos y a factores del crecimiento de células endoteliales vasculares humanos de 121, 145, 189 y 206 aminoácidos relacionados como se describe, p.ej., en Leung *et al.* *Science*, 246: 1306 (1989) y Houck *et al.* *Mol. Endocrin.*, 5: 1806 (1991), junto con las formas alélicas de origen natural y procesadas de los mismos. El VEGF-A es parte de una familia génica que incluye VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF. El VEGF-A se une principalmente a dos receptores tirosina cinasas de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1/KDR), siendo la última el transmisor principal de señales mitogénicas de VEGF-A en células endoteliales vasculares. Adicionalmente, se ha identificado la neuropilina 1 como receptor de isoformas de VEGF-A de unión a heparina, y puede desempeñar un papel en el desarrollo vascular. El término "VEGF" o "VEGF-A" hace referencia también a VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. A veces, el VEGF de una especie específica se indica por términos tales como hVEGF para VEGF humano o mVEGF para VEGF de murino. Típicamente, VEGF hace referencia a VEGF humano. El término "VEGF" se usa también para hacer referencia de formas truncadas o fragmentos del polipéptido que comprenden los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de dichas formas de VEGF puede identificarse en la solicitud, p.ej., por "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF165." Las posiciones aminoacídicas para un VEGF nativo "truncado" se numeran como se indica en la secuencia de VEGF nativa. Por ejemplo, la posición aminoacídica 17 (metionina) en VEGF nativo truncado es también la posición 17 (metionina) en VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene una afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable al VEGF nativo.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. El anticuerpo seleccionado tendrá normalmente afinidad de unión por VEGF, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a hVEGF con un valor de Kd de entre 100 nM-1 pM. Las afinidades de anticuerpo pueden determinarse mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón de superficie (tal como el ensayo BIAcore descrito en la publicación de solicitud PCT n° WO2005/012359); un ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA en inglés) y ensayos competitivos (p.ej. RIA), por ejemplo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede usarse como agente terapéutico en la orientación a e interferencia de enfermedades o afecciones en que está implicada la actividad de VEGF. También el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, p.ej., para evaluar su eficacia como producto terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la materia y dependen del antígeno diana y del uso pretendido para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición de HUVEC, los ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (como se describen en el documento WO

89/06692, por ejemplo), ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y citotoxicidad mediada por complemento (CMC) (patente de EE.UU. 5.500.362) y ensayos de actividad agonista o hematopoyética (véase el documento WO 95/27062). Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF.

Un "antagonista de VEGF" hace referencia a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir las actividades de VEGF, incluyendo su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a VEGF, secuestrando así su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti-receptor de VEGF y antagonistas de receptor de VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina cinasas VEGFR.

Un polipéptido de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia aminoacídica que un polipéptido derivado de la naturaleza. Por tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia aminoacídica de un polipéptido de origen natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término polipéptido de "secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas o secretadas del polipéptido de origen natural (*p.ej.*, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (*p.ej.*, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia aminoacídica con el polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o eliminan uno o más residuos aminoacídicos en el extremo N o C del polipéptido. Por lo común, una variante tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia aminoacídica, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de secuencia aminoacídica y aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia aminoacídica con el polipéptido de secuencia nativa.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales completos o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (*p.ej.*, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo (véase a continuación) siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). El "índice EU como en Kabat" hace referencia a la numeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana.

La "Kd" o "valor de Kd" según esta invención se mide en una realización mediante un ensayo de unión de VEGF radiomarcado (RIA) efectuado con la versión Fab del anticuerpo y una molécula de VEGF como se describe por el siguiente ensayo, que mide la afinidad de unión en solución de Fab por VEGF equilibrando Fab con una concentración mínima de VEGF marcado con (¹²⁵I) (109) en presencia de una serie de titulación de VEGF no marcado, y capturando entonces el VEGF unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 865-881). En un ejemplo, para establecer las condiciones del ensayo, se recubren placas de microvaloración (Dynex) durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y se bloquea posteriormente con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante 2 a 5 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc nº 269620), se mezclan [¹²⁵I]-VEGF(109) 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés, *p.ej.*, Fab-12 (Presta *et al.*, (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599). Se incuban entonces el Fab de interés durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante 65 horas para asegurar que se alcanza el equilibrio. Después de ello, se transfieren las mezclas a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retira entonces la solución y se lava la placa 8 veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando se secan las placas, se añaden 150 µl/pocillo de agente de centelleo (MicroScint-20; Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante 10 minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que dan menos o igual al 20 % de la unión máxima para uso en ensayos de unión competitiva. Según otra realización, se mide la Kd o valor de Kd usando ensayos de resonancia de plasmón de superficie usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de hVEGF (8-109) inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. Se diluye VEGF humano con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de inyección a un caudal de 5 µl/minuto, consiguiendo aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección de VEGF humano, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para medidas cinéticas, se inyectan diluciones en serie 2x de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las tasas de asociación (*k_{on}*) y tasas de disociación (*k_{off}*) usando un modelo de unión Langmuir sencillo de 1 a 1 (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensorgramas de asociación y disociación. Se calculó la constante de

disociación en el equilibrio (K_d) como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, p.ej., Chen, Y., *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 865-881. Si la tasa de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ en el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces la tasa de asociación puede determinarse usando una técnica de apagamiento fluorescente que mide el aumento o reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso de banda) a 25 °C de un anticuerpo anti-VEGF 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de la forma corta de VEGF humano (8-109) o VEGF de ratón medido en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con corte de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Por ejemplo, un anticuerpo antagonista específico de VEGF se une a VEGF e inhibe la capacidad de VEGF de inducir la angiogénesis, de inducir la proliferación de células endoteliales vasculares o de inducir la permeabilidad vascular. En ciertas realizaciones, los anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas inhiben completamente la actividad biológica del antígeno.

A menos que se indique otra cosa, la expresión “anticuerpo multivalente” se usa a lo largo de esta memoria descriptiva para designar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente se genomanipula para tener tres sitios de unión a antígeno o más y generalmente no es un anticuerpo de IgM o IgA de secuencia nativa.

“Fragmentos de anticuerpo” comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, incluyendo generalmente un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y reteniendo por tanto la capacidad de unirse a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo englobados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd, que tiene dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd', que tiene dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv, que tiene los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)), que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo monocaténario (p.ej. Fv monocaténario; scFv) (Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426 (1988) y Huston *et al.*, *PNAS (USA)* 85: 5879-5883 (1988)); (x) “diacuerpos” con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véanse, p.ej., los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)); (xi) “anticuerpos lineales” que comprenden un par de segmentos Fd en serie (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.* *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995) y patente de EE.UU. n° 5.641.870).

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente memoria hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, concretamente, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de origen natural que puedan estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo antígeno. Además, en contraposición con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítotos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” no ha de considerarse que requiera la producción de un anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” puede aislarse también de colecciones de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991) o Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Un fragmento “Fv” es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento de y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan definiendo un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque habitualmente a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

Como se usa en la presente memoria “dominio variable de anticuerpo” hace referencia a las porciones de cadenas ligera y pesada de moléculas de anticuerpo que incluyen las secuencias aminoacídicas de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, concretamente, CDR1, CDR2 y CDR3) y regiones estructurales (FR). VH hace referencia al dominio variable de la cadena pesada. VL hace referencia al dominio variable de la cadena ligera. Según los procedimientos usados en esta invención, las posiciones aminoacídicas asignadas a las CDR y FR pueden definirse según Kabat (“Sequences of Proteins of Immunological Interest” (National Institutes of Health,

Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de aminoácidos de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno es también según la de Kabat.

Como se usa en la presente memoria, “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR; concretamente CDR1, CDR2 y CDR3) hace referencia a los residuos aminoacídicos de un dominio variable de anticuerpo cuya presencia es necesaria para la unión a antígeno. Cada dominio variable tiene típicamente tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de la complementariedad puede comprender residuos aminoacídicos de una “región determinante de la complementariedad” como se define por Kabat (concretamente, aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, “Sequence of Proteins of Immunological Interest”, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (concretamente, aproximadamente los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). En algunos casos, una región determinante de la complementariedad puede incluir aminoácidos tanto de una región CDR definida según Kabat como de un bucle hipervariable. Por ejemplo, la CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.

“Regiones estructurales” (de aquí en adelante FR) son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de CDR. Cada dominio variable tiene típicamente 4 FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen según Kabat, los residuos de FR de cadena ligera están colocados aproximadamente en los residuos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) y 98-107 (LCFR4) y los residuos de FR de cadena pesada están colocados aproximadamente en los residuos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. Si las CDR comprenden residuos aminoacídicos de bucles hipervariables, los residuos de FR de cadena ligera están colocados aproximadamente en los residuos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los residuos de FR de cadena pesada están colocados aproximadamente en los residuos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los residuos de cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de CDR definida por Kabat como aquellos de un bucle hipervariable, los residuos de FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los residuos de FR1 de cadena pesada están en posiciones 1-25 y los residuos de FR2 están en posiciones 36-49.

El fragmento “Fab” contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ comprenden un par de fragmentos Fab que están generalmente ligados covalentemente cerca de sus extremos carboxilo por cisteínas de bisagra entre ellos. Son también conocidos en la materia otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL, que posibilita al scFv formar la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en “The Pharmacology of Monoclonal Antibodies”, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” hace referencia a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH y VL). Al usar un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097, WO 93/11161 y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

La expresión “anticuerpos lineales” hace referencia a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en serie (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo de las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n° 4.816.567 y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (p.ej. de murina) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que se reemplazan residuos de una región hipervariable del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de región estructural (FR) de inmunoglobulina humana por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá opcionalmente también al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia aminoacídica que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se dan a conocer en la presente memoria. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una colección en fago, en que la colección en fago expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996); Sheets *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). Los anticuerpos humanos pueden prepararse también introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p.ej., ratones en que se han inactivado parcial o completamente genes de inmunoglobulina endógenos. Tras la exposición, se observa una producción de anticuerpo humano que se parece estrechamente a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reordenamiento génico, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Inter. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Como alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la inmortalización de linfocitos B humanos productores de un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véanse, p.ej., Cole *et al.*, “Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991) y la patente de EE.UU. n° 5.750.373.

Un anticuerpo “de afinidad madurada” es aquel con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee esta alteración o alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos en la materia. Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad por intercambio de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos estructurales se describe por: Barbas *et al.*, Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.*, Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.*, J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995) y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

Un “sitio de unión a antígeno funcional” de un anticuerpo es aquel que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de unión a antígeno del sitio de unión a antígeno no es necesariamente tan fuerte como en el anticuerpo original del que deriva el sitio de unión a antígeno, pero la capacidad de unirse a antígeno debe ser mensurable usando uno cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos para evaluar la unión de anticuerpo a un antígeno. Además, la afinidad de unión a antígeno de cada uno de los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo multivalente de la presente memoria no tiene que ser cuantitativamente la misma. Para los anticuerpos multiméricos de la presente memoria, puede evaluarse el número de sitios de unión a antígeno funcionales usando análisis de ultracentrifugación como se describe en el ejemplo 2 de la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20050186208. Según este procedimiento de análisis, se combinan diferentes relaciones de antígeno diana a anticuerpo mutimérico y se calcula el peso molecular medio de los complejos suponiendo números diferentes de sitios de unión funcionales. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos para evaluar el número de sitios de unión funcionales.

Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado es aquel que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

Para cribar anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno unido por un anticuerpo de interés, puede efectuarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como se describe en "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988).

Un "anticuerpo dependiente de especie" es aquel que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (concretamente, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente de no más de aproximadamente 1×10^{-8} M y lo más preferiblemente de no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humana que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se definen anteriormente, pero es típicamente un anticuerpo humanizado o humano.

Como se usa en la presente memoria, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" hace referencia a una variante de secuencia aminoacídica del anticuerpo dependiente de especie en la que se han modificado uno o más residuos aminoacídicos del anticuerpo dependiente de especie. Dichos mutantes tienen necesariamente menos de un 100 % de identidad de secuencia o similitud con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia aminoacídica o similitud con la secuencia aminoacídica del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo dependiente de especie, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 % y lo más preferiblemente al menos un 95 %. Identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos (concretamente, el mismo residuo) o similares (concretamente un residuo aminoacídico del mismo grupo basado en propiedades de cadena lateral comunes, véase a continuación) a los residuos de anticuerpo dependiente de especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir la máxima identidad de secuencia porcentual. Se considerará que ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable afecta a la identidad o similitud de secuencia.

Para aumentar la semivida de los anticuerpos o polipéptido que contiene las secuencias aminoacídicas de esta invención, puede unirse un epítipo de unión a receptor silvestre al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, p.ej., en la patente de EE.UU. 5.739.277. Por ejemplo, puede ligarse una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión a receptor silvestre en fase con un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de esta invención, de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico genomanipulada comprenda el epítipo de unión a receptor silvestre y una secuencia polipeptídica de esta invención. Como se usa en la presente memoria, el término "epítipo de unión a receptor silvestre" hace referencia a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG (p.ej., Ghetie *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 18: 739-766 (2000), Tabla 1). Se describen también anticuerpos con sustituciones en una región Fc del mismo y semividas séricas aumentadas en los documentos WO00/42072, WO 02/060919; Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001); Hinton, J. Biol. Chem. 279: 6213-6216 (2004)). En otra realización, la semivida sérica puede aumentarse también, por ejemplo, uniéndose otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, pueden unirse anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los procedimientos de la invención a seroalbúmina o una porción de seroalbúmina que se une al receptor FcRn o a un péptido de unión a seroalbúmina, de modo que la seroalbúmina se una al anticuerpo o polipéptido, p.ej., dichas secuencias polipeptídicas se dan a conocer en el documento WO01/45746. En una realización, el péptido de seroalbúmina para unir comprende la secuencia aminoacídica DICLPRWGCLW. En otra realización, se aumenta la semivida de un Fab mediante estos procedimientos. Véase también Dennis *et al.* J. Biol. Chem. 277: 35035-35043 (2002) para secuencias de péptido de unión a seroalbúmina.

Una "proteína receptora de VEGF quimérica" es una molécula receptora de VEGF que tiene secuencias aminoacídicas derivadas de al menos dos proteínas diferentes, al menos una de las cuales es una proteína receptora de VEGF. En ciertas realizaciones, la proteína receptora de VEGF quimérica es capaz de unirse a VEGF e inhibir su actividad biológica.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos y no proteicos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) a más de un 95 % en peso de anticuerpo determinado por el procedimiento de Lowry, y lo más preferiblemente más de un 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia aminoacídica N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta homogeneidad por PAGE-SDS en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o tinción con plata. Anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, por lo común, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Se entiende por “fragmento” una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferiblemente, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de toda la longitud de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 200, 300, 400, 500, 600 o más nucleótidos o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más.

Un “agente antiangiogénico” o “inhibidor de la angiogénesis” hace referencia a una sustancia de bajo peso molecular, polinucleótido, polipéptido, proteína aislada, proteína recombinante, anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos que inhibe la angiogénesis, vasculogénesis o permeabilidad vascular indeseable, directa o indirectamente. Debería entenderse que el agente antiangiogénico incluye aquellos agentes que se unen al factor angiogénico o su receptor y bloquean su actividad angiogénica. Por ejemplo, es un agente antiangiogénico un anticuerpo u otro antagonista de un agente angiogénico como se define a lo largo de la memoria descriptiva o es conocido en la materia, p.ej. pero sin limitación, anticuerpos de VEGF-A o receptor de VEGF-A (p.ej., receptor KDR o receptor Flt-1), trampa de VEGF, inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec™ (mesilato de imatinib). Los agentes antiangiogénicos incluyen también inhibidores de la angiogénesis nativos, p.ej., angiostatina, endostatina, etc. Véanse, p.ej., Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22: 3172-3179 (2003) (p.ej., Tabla 3 que enumera la terapia antiangiogénica en melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5: 1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22: 6549-6556 (2003) (p.ej., Tabla 2 que enumera los factores antiangiogénicos conocidos) y Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8: 200-206 (2003) (p.ej., Tabla 1 que enumera los agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

Una dosis “de mantenimiento” en la presente memoria hace referencia a una o más dosis de un agente terapéutico administradas al sujeto durante o después de un periodo de tratamiento. Habitualmente, las dosis de mantenimiento se administran a intervalos de tratamiento espaciados tales como aproximadamente cada semana, aproximadamente cada 2 semanas, aproximadamente cada 3 semanas o aproximadamente cada 4 semanas.

“Supervivencia” hace referencia a que el sujeto permanezca vivo, e incluye supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). La supervivencia puede estimarse mediante el procedimiento de Kaplan-Meier y cualquier diferencia en la supervivencia se calcula usando la prueba de rangos logarítmicos estratificados.

“Supervivencia libre de progresión (SLP)” hace referencia al tiempo desde el tratamiento (o asignación aleatoria) hasta la primera progresión de la enfermedad o muerte. Por ejemplo, es el tiempo que el sujeto permanece vivo sin recurrencia del cáncer, p.ej., durante un periodo definido de tiempo tal como aproximadamente 1 mes, 1,2 meses, 2 meses, 2,4 meses, 2,9 meses, 3 meses, 3,5 meses, 4, meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, etc., desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En una realización, la SLP se alarga de aproximadamente 2,9 meses a 3,5 meses (p.ej., con capecitabina). En una realización, la SLP se alarga de aproximadamente 1,2 meses a aproximadamente 2,4 meses (p.ej., con taxano/antraciclina). En un aspecto de la invención, la SLP puede valorarse mediante los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST en inglés).

“Supervivencia global” hace referencia a que el sujeto permanezca vivo durante un periodo definido de tiempo, tal como de aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años, aproximadamente 5 años, aproximadamente 10 años, etc. desde el inicio del tratamiento o desde el diagnóstico inicial. En los estudios en que se basa la invención, el evento usado para el análisis de supervivencia era la muerte por cualquier causa.

Se entiende por “alargar la supervivencia” o “aumentar la probabilidad de supervivencia” aumentar la SLP y/o SG en un sujeto tratado respecto a un sujeto no tratado (concretamente, respecto a un sujeto no tratado con un antagonista específico de VEGF, p.ej., un anticuerpo de VEGF), o respecto a un protocolo de tratamiento de control, tal como tratamiento solo con el agente quimioterapéutico, tal como aquellos usados en el tratamiento de referencia de cáncer de mama, p.ej., capecitabina, taxano, antraciclina, paclitaxel, docetaxel, partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®), doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida o combinaciones de los mismos. La supervivencia se monitoriza durante al menos un mes, dos meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses o al menos aproximadamente 1 año, o al menos aproximadamente 2 años, o al menos aproximadamente 3 años, o al menos aproximadamente 4 años, o al menos aproximadamente 5 años, o al menos aproximadamente 10 años, etc., después del inicio del tratamiento o después del diagnóstico inicial.

El cociente de riesgos instantáneos (HR en inglés) es una definición estadística de tasas de eventos. Con el fin de la invención, se define cociente de riesgos instantáneos como la representación de la probabilidad de un evento en la rama experimental dividida entre la probabilidad de un evento en la rama de control en cualquier punto específico del tiempo. “Cociente de riesgos instantáneos” en el análisis de la supervivencia libre de progresión es un sumario de la diferencia entre dos curvas de supervivencia libre de progresión, que representan la reducción del riesgo de muerte en tratamiento en comparación con el control durante un periodo de seguimiento.

El término “al mismo tiempo” se usa en la presente memoria para hacer referencia a la administración de dos o más agentes terapéuticos, en que al menos parte de la administración se superpone en el tiempo. En consecuencia, la administración al mismo tiempo incluye un régimen de dosificación en que la administración de uno o más agentes continúa después de suspender la administración de uno o más de otros agentes.

Se entiende por “monoterapia” un régimen terapéutico que incluye solo un único agente terapéutico para el tratamiento de cáncer o tumor durante el transcurso del periodo de tratamiento. Monoterapia que usa un antagonista específico de VEGF significa que el antagonista específico de VEGF se administra en ausencia de una terapia anticancerosa adicional durante el periodo de tratamiento.

Se entiende por “terapia de mantenimiento” un régimen terapéutico que se procura para reducir la probabilidad de recurrencia o progresión de la enfermedad. La terapia de mantenimiento puede proporcionarse durante cualquier periodo de tiempo, incluyendo periodos de tiempo alargados hasta la esperanza de vida del sujeto. La terapia de mantenimiento puede proporcionarse después de la terapia inicial o junto con terapias iniciales o adicionales. Las dosificaciones usadas para terapia de mantenimiento pueden variar y pueden incluir dosificaciones disminuidas en comparación con las dosificaciones usadas para otros tipos de terapia. Véase también “mantenimiento” en la presente memoria.

Los términos “cáncer” y “canceroso” hacen referencia a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Se incluyen en esta definición cánceres benignos y malignos, así como tumores durmientes o micrometástasis. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer espinocelular, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endométrico o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no de Hodgkin de bajo grado/folicular (LNH); LNH linfocítico pequeño (LP); LNH de grado intermedio/folicular; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de alto grado; LNH linfoblástico de alto grado; LNH de células pequeñas no segmentadas de alto grado; LNH con enfermedad mediastínica masiva; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LCA); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica y trastorno linfoproliferativo postransplante (TLPT), así como proliferación vascular anormal asociada a facomatosis, edema (tal como el asociado a tumores cerebrales) y síndrome de Meigs

Se entiende por “metástasis” la difusión del cáncer desde su sitio primario a otros lugares del cuerpo. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor primario, penetrar en vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través la corriente sanguínea y crecer en un foco distante (metastatizar) en tejidos normales en otro lugar del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial supeditado a células tumorales que se desprenden del tumor primario, viajan a través de la corriente sanguínea y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro de sangre y pueden crecer, formando una masa potencialmente mortal. Tanto las rutas moleculares estimuladoras como inhibidoras en la célula tumoral regulan este comportamiento, y las interacciones entre la célula tumoral y las células del hospedador en el sitio distante son también significativas.

Se entiende por “sujeto” un mamífero incluyendo, pero sin limitación, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino o felino. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Los pacientes son también sujetos en la presente memoria.

Para los procedimientos de la presente invención, el término “instruir” a un sujeto significa proporcionar instrucciones para la terapia, medicación, tratamiento, regímenes de tratamiento y similares aplicables mediante cualquier medio, pero preferiblemente por escrito, tal como en forma de prospectos u otro material promocional escrito.

Para los procedimientos de la presente invención, el término “promocionar” significa ofrecer, anunciar, vender o describir un fármaco particular, combinación de fármacos o modalidad de tratamiento mediante cualquier medio, incluyendo la escritura, tal como en forma de prospectos. Promocionar en la presente memoria hace referencia a la promoción de un agente terapéutico, tal como un antagonista de VEGF, p.ej., anticuerpo anti-VEGF o agente quimioterapéutico, para una indicación tal como tratamiento de cáncer de mama, en que dicha promoción está autorizada por la Dirección federal de fármacos y alimentos (FDA en inglés) al haberse demostrado que está asociada a una eficacia terapéutica estadísticamente significativa y una seguridad aceptable en una población de sujetos.

Una “población” de sujetos hace referencia a un grupo de sujetos con cáncer, tal como en un ensayo clínico, o como se observa por oncólogos que siguen la aprobación de la FDA para una indicación particular, tal como terapia de cáncer de mama. En una realización, la población comprende al menos aproximadamente 1.200 sujetos.

El término “terapia anticancerosa” hace referencia a una terapia útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos anticancerosos incluyen, pero sin limitación, p.ej., cirugía, agente quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2 (p.ej., Herceptin®), anticuerpos anti-CD20, un antagonista de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (p.ej., un inhibidor de tirosina cinasa), un inhibidor de HER1/EGFR (p.ej., erlotinib (Tarceva®)), inhibidores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (p.ej., Gleevec™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de COX-2 (p.ej., celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (p.ej., anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas receptoras de ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFRbeta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Se incluyen también en la invención combinaciones de los mismos.

El término “agente citotóxico” como se usa en la presente memoria hace referencia a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (p.ej. At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamidea estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (p.ej., calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omegal1 (véase, p.ej., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos tales como clodronato; una esperamicina así como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina cromoproteicos relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolinodoxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antipararrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p.ej., paclitaxel TAXOL® (Bristol- Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® formulación de nanopartículas de paclitaxel genomanipuladas con albúmina exenta de Cremophor, (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône- Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el régimen de tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluyendo el régimen de tratamiento de oxaliplatino (FOLFOX); lapatinib (Tykerb®); inhibidores de PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR (p.ej., erlotinib (Tarceva®)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Se incluyen también en esta definición los agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de regulador de estrógeno (SERM en inglés) incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo con 1,3-dioxolano del nucleósido citosina); oligonucleótidos anticodificantes, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante tales como, por ejemplo, PKC- α , Ralf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (p.ej., ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX® y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "citocina" es un término genético para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas la hormona de crecimiento tal como hormona de crecimiento humano, N-metionilhormona de crecimiento humano y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factores α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- α ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en la presente memoria, el término citocina incluye proteínas de orígenes naturales o del cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* y/o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en fase G1 y la detención en fase M. Los bloqueantes en fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL® e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también actúan secundariamente en la detención en fase S, por ejemplo agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn and Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente pág. 13.

El término "profármaco", como se usa en esta solicitud, hace referencia a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales en comparación con el fármaco original, y que es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma original más activa. Véanse, p.ej., Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, Directed Drug Delivery", Borchardt *et al.*, (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse a una forma de profármaco para uso en esta invención incluyen, pero sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Se entiende por "radioterapia" el uso de rayos γ o rayos β dirigidos para inducir un daño suficiente en una célula como para limitar su capacidad de funcionar normalmente o para destruir la célula en conjunto. Se apreciará que habrá muchos modos conocidos en la materia para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Se

procuran tratamientos típicos en forma de una administración de una vez y las dosificaciones típicas oscilan de 10 a 200 unidades (gray) al día.

5 Se entiende por “reducir o inhibir” la capacidad de causar una reducción global preferiblemente de un 20 % o más, más preferiblemente de un 50 % o más, y lo más preferiblemente de un 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. Reducir o inhibir puede hacer referencia a los síntomas del trastorno que se está tratando, la presencia o tamaño de metástasis o micrometástasis, el tamaño del tumor primario, la presencia o tamaño del tumor durmiente o el tamaño o número de vasos sanguíneos en trastornos angiogénicos.

10 El término “infusión intravenosa” hace referencia a la introducción de un fármaco en la vena de un sujeto animal o humano durante un periodo de tiempo mayor de aproximadamente 5 minutos, preferiblemente entre aproximadamente 30 y 90 minutos, aunque, según la invención, se administra como alternativa una infusión intravenosa durante 10 horas o menos.

15 El término “bolo intravenoso” o “pulso intravenoso” hace referencia a la administración de fármaco a una vena de un animal o ser humano de tal modo que el cuerpo reciba el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, preferiblemente 5 minutos o menos.

20 El término “administración subcutánea” hace referencia a la administración de un fármaco bajo la piel de un sujeto animal o humano, preferiblemente en una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, mediante el suministro prolongado relativamente lento desde un contenedor de fármaco. La bolsa puede crearse pellizcando o estirando la piel separándola del tejido subyacente.

25 El término “infusión subcutánea” hace referencia a la introducción de un fármaco bajo la piel de un sujeto animal o humano, preferiblemente en una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, mediante el suministro prolongado relativamente lento de un contenedor de fármaco durante un periodo de tiempo que incluye, pero sin limitación, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede hacerse mediante implantación subcutánea de una bomba de suministro de fármaco implantada bajo la piel del sujeto animal o humano, en la que la bomba suministra una cantidad predeterminada de fármaco durante un periodo predeterminado de tiempo, tal como 30 minutos, 90 minutos o un periodo de tiempo que cubra la duración del régimen de tratamiento.

30 El término “bolo subcutáneo” hace referencia a la administración de fármaco debajo de la piel de un sujeto animal o humano, en que el suministro de fármaco por bolo es preferiblemente en menos de aproximadamente 15 minutos, más preferiblemente menos de 5 minutos y lo más preferiblemente menos de 60 segundos. La administración es preferiblemente en una bolsa entre la piel y el tejido subyacente, en que la bolsa se crea, por ejemplo, pellizcando o estirando la piel separándola del tejido subyacente.

35 Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos, incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en la presente memoria incluyen cáncer; tumores benignos y malignos; leucemias y malignidades linfoides; trastornos neuronales, gliales, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélulas y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

40 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” hace referencia a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (concretamente, retardar en cierta medida y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (concretamente, retardar en cierta medida y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir en cierta medida el crecimiento tumoral y/o mitigar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al trastorno. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, valorando la duración de la supervivencia, duración de la supervivencia libre de progresión (SLP), tasas de respuesta (TR), duración de la respuesta y/o calidad de vida.

55 “Tratamiento” hace referencia tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos necesitados de tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno así como aquellos en que ha de prevenirse el trastorno.

60 La palabra “marcador”, cuando se usa en la presente memoria, hace referencia a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. El marcador puede ser detectable por sí mismo (p.ej., marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

65

II. ANTICUERPOS ANTI-VEGF Y ANTAGONISTAS

(i) Antígeno de VEGF

- 5 El antígeno de VEGF para usar en la producción de anticuerpos puede ser, p.ej., la molécula VEGF₁₆₅ así como otras isoformas de VEGF o un fragmento de las mismas que contiene el epítipo deseado. Resultarán evidentes para los especialistas en la materia otras formas de VEGF útiles para generar anticuerpos anti-VEGF de la invención.

10 El VEGF humano se obtuvo cribando en primer lugar una colección de ADNc preparada a partir de células humanas usando ADNc de VEGF bovino como sonda de hibridación. Leung *et al.* (1989) Science, 246: 1306. Un ADNc así identificado codifica una proteína de 165 aminoácidos que tiene más de un 95 % de homología con VEGF bovino; se hace referencia típicamente a esta proteína de 165 aminoácidos como VEGF humano (hVEGF) o VEGF₁₆₅. Se confirmó la actividad mitogénica de VEGF humano mediante la expresión de ADNc de VEGF humano en células hospedadoras de mamífero. Los medios acondicionados con células transfectadas con ADNc de VEGF humano promovieron la proliferación de células endoteliales capilares, mientras que las células de control no. Leung *et al.* (1989) Science, *supra*. Se hicieron esfuerzos adicionales por clonar y expresar VEGF mediante técnicas de ADN recombinante. (Véase, p.ej., Ferrara, Laboratory Investigation 72: 615-618 (1995), y las referencias citadas en el mismo).

20 El VEGF se expresa en una variedad de tejidos como formas homodiméricas múltiples (121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero) resultantes de un corte y empalme alternativo de ARN. El VEGF₁₂₁ es un mitógeno soluble que no se une a heparina; las formas más largas de VEGF se unen a heparina con afinidad progresivamente mayor. Las formas de unión a heparina de VEGF pueden escindirse del extremo carboxilo mediante plasmina, liberando una forma o formas difusibles de VEGF. La secuenciación aminoacídica del péptido carboxiterminal identificado después de escisión con plasmina es Arg₁₁₀-Ala₁₁₁. La proteína "central" aminoterminal VEGF (1-110), aislada como un homodímero, se une a anticuerpos monoclonales neutralizantes (tales como los anticuerpos a los que se hace referencia como 4.6.1 y 3.2E3.1.1) y a formas solubles de receptores de VEGF con afinidad similar en comparación con el homodímero de VEGF₁₆₅ intacto.

30 Se han identificado recientemente también varias moléculas estructuralmente relacionadas con VEGF, incluyendo factor de crecimiento de placenta (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Ferrara y Davis-Smyth (1987) Endocr. Rev., *supra*; Ogawa *et al.* J. Biological Chem. 273: 31273-31281(1998); Meyer *et al.* EMBO J., 18: 363-374(1999). Se ha identificado un receptor tirosina cinasa Flt-4 (VEGFR-3) como el receptor de VEGF-C y VEGF-D. Joukov *et al.* EMBO J. 15: 1751(1996); Lee *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1988-1992 (1996); Achen *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 548-553. Se ha mostrado que VEGF-C está implicado en la regulación de la angiogénesis linfática. Jeltsch *et al.* Science 276: 1423-1425(1997).

40 Se han identificado dos receptores de VEGF, Flt-1 (también llamado VEGFR-1) y KDR (también llamado VEGFR-2). Shibuya *et al.* (1990) Oncogene 8: 519-527; de Vries *et al.* (1992) Science 255: 989-991; Terman *et al.* (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187: 1579-1586. Se ha mostrado que la neuropilina 1 es un receptor selectivo de VEGF, capaz de unirse a isoformas de VEGF de unión a heparina (Soker *et al.* (1998) Cell 92: 735-45).

(ii) Anticuerpos anti-VEGF

45 Los anticuerpos anti-VEGF que son útiles en los procedimientos de la invención incluyen cualquier anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se una con suficiente afinidad y especificidad a VEGF y pueda reducir o inhibir la actividad biológica de VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF habitualmente no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF.

50 En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-VEGF incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado según Presta *et al.* (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF es "bevacizumab (BV)", también conocido como "rhuMAb VEGF" o "AVASTIN®". Comprende regiones estructurales de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de la complementariedad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal de murino anti-hVEGF A.4.6.1, que bloquea la unión de VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente un 93 % de la secuencia aminoacídica de bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones estructurales, deriva de IgG humana, y aproximadamente un 7 % de la secuencia deriva del anticuerpo de murino A4.6.1.

60 El bevacizumab (AVASTIN®) fue la primera terapia antiangiogénica aprobada por la FDA y está aprobado para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico (tratamiento de primera y segunda línea en combinación con quimioterapia basada en 5-FU intravenoso), carcinoma pulmonar no microcítico no escamoso (CPNMNE) avanzado (tratamiento de primera línea de CPNMNE recurrente o metastásico localmente avanzado no resecable en combinación con carboplatino y paclitaxel) y cáncer de mama metastásico negativo de HER2 (cáncer de mama metastásico negativo de HER2 anteriormente no tratado en combinación con paclitaxel).

El bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen además en la patente de EE.UU. nº 6.884.879 expedida el 28 de febrero de 2005. Anticuerpos adicionales incluyen los anticuerpos de serie G6 o B20 (p.ej., G6-31, B20-4.1), como se describe en la publicación PCT nº WO2005/012359, publicación PCT nº WO2005/044853 y publicación de patente de EE.UU. 60/991.302. Para anticuerpos adicionales, véanse las patentes de EE.UU. nº 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.054.297; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. nº 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126 y Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288: 149-164 (2004). Otros anticuerpos incluyen aquellos que se unen a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104 o, como alternativa, que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia aminoacídica:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW

INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP

HYYGSSHWYF DWWGQGTLLV TSS (SEQ ID No. 1)

y una región variable de cadena ligera que comprende la siguiente secuencia aminoacídica:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIFY

TSSLHSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR (SEQ ID No. 2).

Un "anticuerpo de serie G6" según esta invención es un anticuerpo anti-VEGF que deriva de una secuencia de un anticuerpo G6, o un anticuerpo derivado de G6 según una cualquiera de las figuras 7, 24-26 y 34-35 de la publicación PCT nº WO2005/012359. Véase también la publicación PCT nº WO2005/044853. En una realización, el anticuerpo de serie G6 se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, Y21, Q22, Y25, D63, 83 y Q89.

Es un "anticuerpo de serie B20" según esta invención un anticuerpo anti-VEGF que deriva de una secuencia del anticuerpo B20, o un anticuerpo derivado de B20 según una cualquiera de las Figuras 27-29 de la publicación PCT nº WO2005/012359. Véanse también la publicación PCT nº WO2005/044853 y la solicitud de patente de EE.UU. 60/991.302. En una realización, el anticuerpo de serie B20 se une a un epítipo funcional en VEGF humano que comprende los residuos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104.

Un "epítipo funcional" según esta invención hace referencia a los residuos aminoacídicos de un antígeno que contribuyen activamente a la unión de un anticuerpo. La mutación de uno cualquiera de los residuos activamente contribuyentes del antígeno (por ejemplo, la mutación de VEGF de tipo silvestre por mutación con alanina u homólogo) perturbará la unión del anticuerpo de tal modo que la relación de afinidad relativa (CI_{50} de VEGF mutante/ CI_{50} de VEGF de tipo silvestre) del anticuerpo sea mayor de 5 (véase el ejemplo 2 del documento WO2005/012359). En una realización, la relación de afinidad relativa se determina mediante una ELISA de presentación en fago de unión a solución. Brevemente, se recubren inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC) durante una noche a 4 °C con una forma Fab del anticuerpo para ensayar a una concentración de 2 µg/ml en PBS, y se bloquea con PBS, 0,5 % de BSA y 0,05 % de Tween20 (PBT) durante 2 h a temperatura ambiente. Se incuban en primer lugar diluciones en serie de mutantes puntuales de alanina de hVEGF de presentación en fago (forma de 8-109 residuos) o hVEGF de tipo silvestre (8-109) en PBT sobre placas recubiertas con Fab durante 15 min a temperatura ambiente, y se lavan las placas con PBS y 0,05 % de Tween20 (PBST). Se detecta el fago unido con un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-M13 con peroxidasa de rábano picante (Amersham Pharmacia) diluido 1:5000 en PBT, revelado con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) durante aproximadamente 5 min, se inactiva con H_3PO_4 1 M y se lee espectrofotométricamente a 450 nm. La relación de valores de CI_{50} ($CI_{50,ala}/CI_{50,wt}$) representa el número de reducciones de la afinidad de unión (la afinidad de unión relativa).

(iii) Moléculas receptoras de VEGF

Los dos receptores de VEGF mejor caracterizados son VEGFR1 (también conocido como Flt-1) y VEGFR2 (también conocido como KDR y FLK-1 para el homólogo de murino). La especificidad de cada receptor por cada miembro de la familia de VEGF varía, pero el VEGF-A se une tanto a Flt-1 como a KDR. Tanto Flt-1 como KDR pertenecen a la familia de receptores tirosina cinasas (RTK). Los RTK comprenden una gran familia de receptores transmembrana

con diversas actividades biológicas. Se han identificado al menos diecinueve (19) subfamilias de RTK distintas. La familia de receptores tirosina cinasas (RTK) incluye receptores que son cruciales para el crecimiento y diferenciación de una variedad de tipos celulares (Yarden y Ullrich (1988) Ann. Rev. Biochem. 57: 433-478; Ullrich y Schlessinger (1990) Cell 61: 243-254). La función intrínseca de los RTK se activa tras la unión a ligando, lo que da como resultado la fosforilación del receptor y de múltiples sustratos celulares, y posteriormente una variedad de respuestas celulares. (Ullrich y Schlessinger (1990) Cell 61: 203-212). Por tanto, la transducción de señal mediada por receptor tirosina cinasa se inicia por la interacción extracelular con un factor de crecimiento específico (ligando), seguido típicamente de dimerización de receptor, estimulación de la actividad proteína tirosina cinasa intrínseca y transfosforilación del receptor. Se crean así sitios de unión para moléculas de transducción de señal intracelular que conducen a la formación de complejos con un espectro de moléculas de señalización citoplasmática que faciliten la respuesta celular apropiada (p.ej., división celular, diferenciación, efectos metabólicos, cambios en el microentorno extracelular) véase Schlessinger y Ullrich (1992) Neuron 9: 1-20. Estructuralmente, tanto Flt-1 como KDR tienen siete dominios de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular, una sola región transmembrana y una secuencia de tirosina cinasa de consenso que se interrumpe por un dominio de inserto de cinasa. Matthews *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9026-9030; Terman *et al.* (1991) Oncogene 6: 1677-1683. El dominio extracelular está implicado en la unión de VEGF y el dominio intracelular está implicado en la transducción de señal.

Pueden usarse en los procedimientos de la invención moléculas receptoras de VEGF, o fragmentos de las mismas, que se unen específicamente a VEGF para unirse a y secuestrar la proteína VEGF, previniendo así su señalización. En ciertas realizaciones, la molécula receptora de VEGF, o fragmento de unión a VEGF de la misma, es una forma soluble tal como sFlt-1. Una forma soluble del receptor ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica de la proteína VEGF al unirse a VEGF, previniendo así que se una a sus receptores naturales presentes sobre la superficie de células diana. Se incluyen también proteínas de fusión de receptor de VEGF, cuyos ejemplos se describen a continuación.

Es una proteína receptora de VEGF quimérica una molécula receptora que tiene secuencias aminoacídicas derivadas de al menos dos proteínas diferentes, al menos una de las cuales es una proteína receptora de VEGF (p.ej., el receptor flt-1 o KDR) que es capaz de unirse a e inhibir la actividad biológica de VEGF. En ciertas realizaciones, las proteínas receptoras de VEGF quiméricas de la invención consisten en secuencias aminoacídicas derivadas de dos diferentes moléculas receptoras de VEGF; sin embargo, las secuencias aminoacídicas que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o los siete dominios de tipo Ig de la región de unión a ligando extracelular del receptor flt-1 y/o KDR pueden ligarse con secuencias aminoacídicas de otras proteínas no relacionadas, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina. Otras secuencias aminoacídicas con las que se combinan los dominios de tipo Ig resultarán fácilmente evidentes para los especialistas en la materia. Los ejemplos de proteínas receptoras de VEGF quiméricas incluyen, por ejemplo, Flt-1/Fc, KDR/Fc o Flt-1/KDR/Fc (también conocido como trampa de VEGF) solubles. (Véase por ejemplo la publicación de solicitud PCT nº WO97/44453).

Una proteína receptora de VEGF soluble o proteínas receptoras de VEGF quiméricas de la invención incluyen proteínas receptoras de VEGF que no están fijadas a la superficie de células mediante un dominio transmembrana. Como tales, las formas solubles del receptor de VEGF, incluyendo proteínas receptoras quiméricas, aunque capaces de unirse a e inactivar VEGF, no comprenden un dominio transmembrana y por tanto generalmente no se asocian con la membrana celular de células en que se expresa la molécula.

III. USOS TERAPÉUTICOS Y COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-VEGF

La invención engloba la terapia antiangiogénica, una estrategia de tratamiento del cáncer novedosa orientada a inhibir el desarrollo de los vasos sanguíneos tumorales necesarios para proporcionar nutrientes para apoyar el crecimiento tumoral. Debido a que la angiogénesis está implicada tanto en el crecimiento de tumor primario como la metástasis, el tratamiento antiangiogénico proporcionado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico del tumor en el sitio primario, así como de prevenir la metástasis de tumores en los sitios secundarios, permitiendo por lo tanto atacar a los tumores con otras terapias.

Específicamente, se proporcionan en la presente memoria procedimientos de tratamiento de un sujeto diagnosticado con cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado, que comprenden administrar al sujeto un régimen de tratamiento que combina una cantidad eficaz de al menos un agente quimioterapéutico y un anticuerpo anti-VEGF, en los que dicho sujeto no ha recibido ninguna quimioterapia por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. Opcionalmente, el sujeto no ha recibido quimioterapia complementaria anterior por recurrencia en 12 meses o menos desde la última dosis. El régimen de tratamiento que combina quimioterapia y administración de anti-VEGF alarga eficazmente la supervivencia libre de progresión (SLP) del sujeto. Se proporcionan además en la presente memoria usos de un anticuerpo anti-VEGF con al menos un agente quimioterapéutico en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado en un sujeto, en los que dicho sujeto no ha recibido ninguna quimioterapia por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. Opcionalmente, el sujeto no ha recibido quimioterapia complementaria anterior por recurrencia en 12 meses o menos desde la última dosis. El uso de anti-VEGF y agente quimioterapéutico alarga eficazmente la supervivencia libre de progresión (SLP) del sujeto. Se proporcionan también en la presente memoria anticuerpos anti-VEGF para uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer de mama localmente recurrente o metastásico en un sujeto, comprendiendo el

procedimiento administrar al sujeto un régimen de tratamiento que combina una cantidad eficaz de al menos un agente quimioterapéutico y un anticuerpo anti-VEGF, en los que dicho sujeto no ha recibido ninguna quimioterapia por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. Opcionalmente, el sujeto no ha recibido quimioterapia complementaria anterior por recurrencia en 12 meses o menos desde la última dosis. El uso de anti-VEGF y agente quimioterapéutico alarga eficazmente la supervivencia libre de progresión (SLP) del sujeto. En ciertas realizaciones, en cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones de la invención, la administración de quimioterapia y anticuerpo anti-VEGF tiene un perfil de seguridad que es consistente con los resultados de ensayos de bevacizumab anteriores (véase, por ejemplo, el prospecto de bevacizumab).

En algunas realizaciones de la invención, el sujeto es negativo de HER2. En algunas realizaciones de la invención, el sujeto es positivo de HER2. HER2 se reconoce como un factor de predicción y pronóstico importante en algunos cánceres de mama. Véanse, p.ej., Slamon DJ, *et al.* Science. 1989; 244: 707-712 y Sjögren S, *et al.* J. Clin. Oncol. 1998; 16: 462-469. La amplificación génica de HER2 es un cambio genético permanente que da como resultado la sobreexpresión continua del receptor HER2 (proteína HER2). Véanse, p.ej., Simon R, *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 2001; 93: 1141-1146 y Sliwkowski MX, *et al.* Semin Oncol. 1999; 26 (supl. 12): 60-70. Varios estudios han mostrado que la sobreexpresión de HER2 (por copias extra del gen mismo o una cantidad en exceso del producto proteico del gen) está asociada a una supervivencia global reducida. Véase, p.ej., Slamon DJ, *et al.* Science. 1987; 235: 177-182 y Paik S, *et al.* J. Clin. Oncol. 1990; 8: 103-112. Están disponibles varios ensayos comerciales para determinar el estado de HER2, p.ej., HercepTest® y Pathway™ para proteína y PathVysion® y HER2 FISH pharmDx™ para alteración génica.

Terapias de combinación

La invención presenta el uso o composiciones de una combinación de al menos un antagonista específico de VEGF con una o más terapias anticancerosas adicionales. Los ejemplos de terapias anticancerosas incluyen, sin limitación, cirugía, radioterapia, bioterapia, inmunoterapia, quimioterapia o una combinación de estas terapias. Además, pueden usarse agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos y antiproliferativos en combinación con el antagonista específico de VEGF.

En ciertos aspectos de cualquiera de los procedimientos y usos, la invención proporciona el tratamiento de cáncer de mama mediante la administración de cantidades eficaces de un anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos a un sujeto susceptible de, o diagnosticado con, cáncer de mama metastásico localmente recurrente o metastásico anteriormente no tratado. Pueden usarse una variedad de agentes quimioterapéuticos en los procedimientos y usos de tratamiento combinado de la invención. Se proporciona en la presente memoria una lista ejemplar y no limitante de los agentes quimioterapéuticos contemplados en "Definición" o se describen en la presente memoria.

En un ejemplo, la invención presenta procedimientos y usos de un antagonista específico de VEGF con uno o más agentes quimioterapéuticos (p.ej. un cóctel) o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el agente quimioterapéutico es, por ejemplo, terapia de capecitabina, taxano, antraciclina, paclitaxel, docetaxel, partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®), doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el antagonista de VEGF (p.ej., anticuerpo anti-VEGF) se combina con lapatinib (Tykerb®). La administración combinada incluye administración simultánea, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que hay preferiblemente un periodo de tiempo mientras ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Pueden usarse programas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos según las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el facultativo especialista. Se describen también programas de preparación y dosificación de quimioterapia en "Chemotherapy Service Ed.", M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del antagonista específico de VEGF o puede procurarse simultáneamente con el mismo.

En algunos otros aspectos de cualquiera de los procedimientos y usos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia tumoral de combinación con el anticuerpo de la invención incluyen antagonistas u otros factores que están implicados en el crecimiento tumoral, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2), ErbB3, ErbB4 o TNF. A veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al sujeto. En una realización, el anticuerpo de VEGF se coadministra con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse en primer lugar, seguido del anticuerpo de VEGF. Sin embargo, se contempla también la administración simultánea o administración del anticuerpo de VEGF en primer lugar. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas usadas actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y anticuerpo anti-VEGF.

La formulación de la presente memoria puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos que se unan a EGFR, VEGF (p.ej., un anticuerpo que se una a un epítipo diferente o al mismo epítipo en VEGF), VEGFR

o ErbB2 (p.ej., Herceptin®) en una formulación. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de VEGFR. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

En ciertos aspectos de cualquiera de los procedimientos y usos, otros agentes terapéuticos útiles para terapia del cáncer en combinación con el anticuerpo de la invención incluyen otros agentes antiangiogénicos. Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y son conocidos en la materia, incluyendo los enumerados por Carmeliet y Jain (2000). En una realización, se usa el anticuerpo anti-VEGF de la invención en combinación con otro antagonista de VEGF o un antagonista de receptor de VEGF tal como variantes de VEGF, fragmentos de receptor de VEGF soluble, aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes anti-VEGFR, inhibidores de bajo peso molecular de tirosina cinasas VEGFR y cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, o además, pueden coadministrarse dos o más anticuerpos anti-VEGF al sujeto.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de antagonista específico de VEGF dependerá del tipo de enfermedad para tratar, como se define anteriormente, de la gravedad y desarrollo de la enfermedad, si el antagonista específico de VEGF se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del sujeto, la respuesta al antagonista específico de VEGF y el criterio del médico a cargo. El antagonista específico de VEGF se administra adecuadamente al sujeto de una vez o en una serie de tratamientos. En un régimen de terapia de combinación, el antagonista específico de VEGF y el uno o más agentes terapéuticos anticancerosos de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. Como se usa en la presente memoria, es una cantidad terapéuticamente eficaz aquella cuya coadministración de un antagonista específico de VEGF y uno o más de otros agentes terapéuticos o cuya administración de una composición de la invención dé como resultado la reducción o inhibición del cáncer como se describe anteriormente. Es una cantidad terapéuticamente sinérgica aquella cantidad de un antagonista específico de VEGF y uno o más de otros agentes terapéuticos necesaria para reducir o eliminar sinérgica o significativamente las afecciones o síntomas asociados a una enfermedad particular.

El antagonista específico de VEGF y el uno o más de otros agentes terapéuticos pueden administrarse simultánea o secuencialmente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para reducir o eliminar la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor durmiente o micrometástasis. El antagonista específico de VEGF y el uno o más de otros agentes terapéuticos pueden administrarse como terapia de mantenimiento para prevenir o reducir la probabilidad de recurrencia del tumor.

Como se entenderá por los especialistas en la materia, las dosis apropiadas de agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerosos serán generalmente aproximadamente aquellas ya empleadas en terapias clínicas, p.ej., cuando los agentes quimioterapéuticos se administran solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Aparecerá probablemente una variación en la dosificación dependiendo de la afección que se esté tratando. El médico que administra el tratamiento podrá determinar la dosis apropiada para un sujeto individual.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el sujeto puede someterse a radioterapia.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones, el anticuerpo de VEGF administrado es un anticuerpo desnudo intacto. Sin embargo, el anticuerpo de VEGF puede conjugarse con un agente citotóxico. En ciertas realizaciones de cualquiera de los procedimientos y usos, el anticuerpo conjugado y/o antígeno al que se une se internalizan por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del conjugado para eliminar la célula cancerosa a la que se une. En una realización, el agente citotóxico se orienta a o interfiere con ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

La invención presenta también un procedimiento de instrucción a un sujeto humano con cáncer de mama o un personal sanitario mediante la provisión de instrucciones para recibir tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF para aumentar el tiempo de supervivencia libre de progresión, para reducir el riesgo de recurrencia del cáncer del sujeto o para aumentar la probabilidad de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además instrucciones para recibir tratamiento con al menos un agente quimioterapéutico. El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF puede ser coincidente con o secuencial al tratamiento con el agente quimioterapéutico. En ciertas realizaciones, el sujeto se trata como se instruye por el procedimiento de instrucción. El tratamiento de cáncer de mama mediante la administración de un anticuerpo anti-VEGF con o sin quimioterapia puede continuarse hasta la recurrencia del cáncer o muerte.

La invención proporciona además un procedimiento promocional que comprende promocionar la administración de un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento de cáncer de mama en un sujeto humano. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la administración de al menos un agente quimioterapéutico. La administración del anticuerpo anti-VEGF puede ser coincidente con o secuencial a la administración del agente quimioterapéutico. La promoción puede realizarse mediante cualquier medio disponible. En algunas realizaciones, la promoción es mediante un prospecto que acompaña a la formulación comercial del anticuerpo anti-VEGF. La promoción puede ser

también mediante un prospecto que acompaña a la formulación comercial del agente quimioterapéutico. La promoción puede ser mediante comunicación escrita u oral a un médico o personal sanitario. En algunas realizaciones, la promoción es mediante un prospecto en que el prospecto proporciona instrucciones para recibir terapia de cáncer de mama con anticuerpo anti-VEGF. En una realización más, el prospecto incluye algunos o todos de los resultados del Ejemplo 1. En algunas realizaciones, la promoción es seguida por el tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéutico.

La invención proporciona un modelo de negocio que comprende comercializar un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento de cáncer de mama en un sujeto humano para aumentar el tiempo de supervivencia libre de progresión del sujeto, para reducir la probabilidad de recurrencia del cáncer del sujeto o aumentar la probabilidad de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además comercializar un agente quimioterapéutico para uso en combinación con el anticuerpo anti-VEGF. En algunas realizaciones, la comercialización es seguida del tratamiento del sujeto con el anticuerpo anti-VEGF con o sin el agente quimioterapéutico.

Se proporciona también un modelo de negocio que comprende comercializar un agente quimioterapéutico en combinación con un anticuerpo anti-VEGF para el tratamiento de cáncer de mama en un sujeto humano para aumentar el tiempo de supervivencia libre de progresión del sujeto, para reducir la probabilidad de recurrencia del cáncer del sujeto o aumentar la probabilidad de supervivencia del sujeto. En algunas realizaciones, la comercialización es seguida del tratamiento del sujeto con la combinación de agente quimioterapéutico y anticuerpo anti-VEGF.

IV. DOSIFICACIONES Y DURACIÓN

La composición de antagonista específico de VEGF se formulará, dosificará y administrará de forma consistente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se esté tratando, el sujeto particular que se esté tratando, la afección clínica del sujeto individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los facultativos médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" de antagonista específico de VEGF para administrar estará dictada por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar o estabilizar el cáncer; para aumentar el tiempo hasta la progresión (duración de la supervivencia libre de progresión) o para tratar o prevenir la aparición o recurrencia de un tumor, un tumor durmiente o micrometástasis. El antagonista específico de VEGF no tiene que formularse, pero opcionalmente se formula con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar cáncer o el riesgo de desarrollar cáncer. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista específico de VEGF presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores discutidos anteriormente. Estos se usan generalmente a las mismas dosificaciones y con las mismas vías de administración que se usan anteriormente en la presente memoria, o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones empleadas hasta el momento.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (p.ej., 0,1-20 mg/kg) de antagonista específico de VEGF es una dosificación candidata inicial para administración al sujeto tanto, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las dosificaciones particularmente deseables incluyen, por ejemplo, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se trata el cáncer, medido mediante los procedimientos descritos anteriormente o conocidos en la materia. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En un ejemplo, si el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo de la invención se administra una vez por semana, cada dos semanas o cada tres semanas, a un intervalo de dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo pero sin limitación 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg o 15 mg/kg. La progresión de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. En otras realizaciones, se usa dicho régimen de dosificación en combinación con un régimen de quimioterapia como terapia de primera línea para tratar cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. Se proporciona más información sobre las dosificaciones adecuadas en el ejemplo siguiente.

El periodo de terapia continuará mientras esté médicamente indicado o hasta conseguir un efecto terapéutico deseado (p.ej., aquellos descritos en la presente memoria). En ciertas realizaciones, la terapia de antagonista específico de VEGF continúa durante 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o durante un periodo de años hasta la esperanza de vida del sujeto.

Los antagonistas específicos de VEGF de la invención se administran a un sujeto, p.ej., un sujeto humano, de acuerdo con procedimientos conocidos tales como administración intravenosa en bolo o infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. La administración local se desea particularmente si están asociados muchos efectos secundarios o toxicidad con el antagonista de VEGF. Puede usarse también una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con

un polinucleótido que codifica un antagonista de VEGF. Las células transfectadas o transducidas se devuelven entonces al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de un amplio intervalo de tipos incluyendo, sin limitación, células hematopoyéticas (p.ej., células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T o linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

Por ejemplo, si el antagonista específico de VEGF es un anticuerpo, el anticuerpo se administra mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento inmunosupresor local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se procura mediante inyecciones, lo más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista específico de VEGF se administra por vía local, p.ej., mediante inyecciones directas cuando el trastorno o localización del tumor lo permite, y las inyecciones pueden repetirse periódicamente. El antagonista específico de VEGF puede suministrarse también por vía sistémica al sujeto o directamente a las células tumorales, p.ej., a un tumor o lecho tumoral después de extirpación quirúrgica del tumor, para prevenir o reducir la recurrencia total o metástasis, por ejemplo de un tumor durmiente o micrometástasis.

Como alternativa, puede suministrarse una molécula inhibidora de ácido nucleico o polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un antagonista específico de VEGF a las células apropiadas del sujeto. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico puede dirigirse al tumor mismo.

El ácido nucleico puede introducirse en las células mediante cualquier medio apropiado para el vector empleado. Son bien conocidos en la materia muchos de dichos procedimientos (Sambrook *et al.*, *supra*, y Watson *et al.*, "Recombinant DNA", capítulo 12, 2ª edición, Scientific American Books, 1992). Los ejemplos de procedimientos de suministro génico incluyen transfección mediada por liposoma, electroporación, procedimientos con fosfato de calcio/DEAE-dextrano, pistola génica y microinyección.

V. FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Se preparan para almacenamiento formulaciones terapéuticas de los agentes (p.ej., anticuerpos) usados de acuerdo con la invención mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales ("Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menores de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p.ej., complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Se describen formulaciones de anticuerpo anti-VEGF liofilizadas en el documento WO 97/04801.

Opcional, pero preferiblemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, típicamente p.ej. cloruro de sodio, y preferiblemente a concentraciones aproximadamente fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración de conservante oscila de 0,1 a 2,0 %, típicamente v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en la técnica farmacéutica. Son ejemplos de conservantes alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración de 0,005 a 0,02 %.

Típicamente, se suministra bevacizumab para usos terapéuticos en viales de un solo uso libres de conservantes de 100 mg y 400 mg para suministrar 4 ml o 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml). Se formula el producto de 100 mg en 240 mg de α,α -trehalosa dihidratada, 23,2 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidratado), 4,8 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 1,6 mg de polisorbato 20 y agua para inyecciones USP. Se formula el producto de 400 mg en 960 mg de α,α -trehalosa dihidratada, 92,8 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidratado), 19,2 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 6,4 mg de polisorbato 20 y agua para inyecciones USP. Véase también la etiqueta de bevacizumab.

La formulación de la presente memoria puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no

se afecten de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos que se unan a EGFR, VEGF (p.ej. un anticuerpo que se una a un epítipo diferente en VEGF), VEGFR o ErbB2 (p.ej., Herceptin®) en una formulación. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de VEGFR. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los ingredientes activos pueden atraparse también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfásica, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo) respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, p.ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE.UU. n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado la pérdida de actividad biológica y posibles cambios de inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular mediante intercambio tio-disulfuro, puede conseguirse la estabilización modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

VI. EFICACIA DEL TRATAMIENTO

La ventaja principal de cualquiera de los procedimientos, usos y composiciones proporcionados en la presente memoria es la capacidad de producción de notables efectos anticancerosos en un sujeto humano sin causar toxicidades significativas ni efectos adversos, de modo que el sujeto se beneficie del tratamiento en general. En una realización de cualquiera de los procedimientos, usos o composiciones, el perfil de seguridad es comparable con los estudios de fase III con bevacizumab anteriores. La eficacia del tratamiento de la invención puede medirse mediante varios criterios de valoración usados comúnmente para evaluar tratamientos de cáncer incluyendo, pero sin limitación, regresión tumoral, disminución del peso o tamaño tumoral, tiempo hasta la progresión, duración de la supervivencia, supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta global, duración de la respuesta y calidad de vida. Debido a que los agentes antiangiogénicos de la invención se orientan a los vasos tumorales y no necesariamente a las células neoplásicas mismas, representan una clase única de fármacos anticancerosos, y por lo tanto pueden requerir medidas y definiciones únicas de las respuestas clínicas ante fármacos. Por ejemplo, una disminución tumoral de más de un 50 % en un análisis bidimensional es el corte estándar para declarar una respuesta. Sin embargo, el anticuerpo anti-VEGF de la invención puede causar la inhibición de la difusión metastásica sin disminución del tumor primario, o puede simplemente ejercer un efecto tumoristático. En consecuencia, deberían emplearse enfoques novedosos para determinar la eficacia de una terapia antiangiogénica, incluyendo por ejemplo la medida de marcadores plasmáticos o urinarios de angiogénesis y la medida de la respuesta mediante imagenología radiológica.

En otra realización, la invención proporciona procedimientos para aumentar la supervivencia libre de progresión de un sujeto humano susceptible de o diagnosticado con un cáncer. El tiempo hasta la progresión de la enfermedad se define como el tiempo desde la administración del fármaco hasta la progresión de la enfermedad o muerte. En una realización preferida, el tratamiento de combinación de la invención que usa anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la supervivencia libre de progresión en al menos aproximadamente 1 mes, 1,2 meses, 2 meses, 2,4 meses, 2,9 meses, 3,5 meses, preferiblemente en aproximadamente 1 a aproximadamente 5 meses, en comparación con un tratamiento con quimioterapia sola. En una realización, la mediana de SLP en meses (IC del 95 %) es de 9,2 meses (8,6, 10,1) en los sujetos tratados con terapia de bevacizumab y taxano (p.ej., docetaxel o partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®))/terapia de antraciclina (p.ej., doxorubicina, epirubicina o combinaciones de los mismos) en comparación con 8,0 meses (6,7, 8,4) de la terapia con taxano/antraciclina sin bevacizumab, con un HR (IC del 95 %) de 0,644 (0,522, 0,795) y un valor de p (rango logarítmico) menor de 0,0001. En una realización, la SLP en los

sujetos tratados con bevacizumab y taxano/antraciclina es de 10,7 meses en comparación con 8,3 en sujetos tratados con placebo y taxano/antraciclina. En una realización, la mediana de SLP en meses (IC del 95 %) es de 8,6 meses (8,1, 9,5) en los sujetos tratados con bevacizumab y capecitabina en comparación con 5,7 meses (4,3, 6,2) con terapia de capecitabina sin bevacizumab, con un HR (IC del 95 %) de 0,688 (0,564, 0,840) y un valor de p (rango logarítmico) de 0,0002. En una realización, la SLP en los sujetos tratados con bevacizumab y capecitabina es de 9,7 meses en comparación con 6,2 en sujetos tratados con placebo y capecitabina.

En aún otra realización, el tratamiento de la invención aumenta significativamente la tasa de respuesta en un grupo de sujetos humanos susceptibles de o diagnosticados con un cáncer que se tratan con diversos productos terapéuticos. La tasa de respuesta se define como el porcentaje de sujetos tratados que respondieron al tratamiento. En un aspecto, el tratamiento de combinación de la invención que usa anticuerpo anti-VEGF y uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la tasa de respuesta en el grupo de sujetos tratados, en comparación con el grupo tratado con quimioterapia sola.

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para aumentar la duración de la respuesta en un sujeto humano o un grupo de sujetos humanos susceptibles de o diagnosticados con un cáncer. La duración de la respuesta se define como el tiempo desde la respuesta inicial a la progresión de la enfermedad.

En una realización, la invención puede usarse para aumentar la duración de la supervivencia de un sujeto humano susceptible de o diagnosticado con un cáncer.

VII. Producción de anticuerpo

(i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se cultivan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un coadyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie para inmunizar, p.ej., hemocianina de lapa bocallave, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, p.ej., 100 μg o 5 μg de proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de coadyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, se someten a inyección de recuerdo los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en coadyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días después, se extrae sangre a los animales y se ensaya en el suero el título de anticuerpo. Se someten a inyección de recuerdo los animales hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, se somete a inyección de recuerdo el animal con conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados pueden prepararse también en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. Se usan también adecuadamente agentes agregantes tales como alúmina para potenciar la respuesta inmunitaria.

(ii) Anticuerpos monoclonales

Están disponibles en la materia diversos procedimientos para preparar anticuerpos monoclonales de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975) o mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE.UU. n° 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster o mono macaco, como se describe anteriormente en la presente memoria para desencadenar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, formando una célula de hibridoma (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), previniendo dichas sustancias el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Son células de mieloma preferidas aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable a alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como

medio HAT. Entre estas, son líneas celulares de mieloma preferidas las líneas de mieloma de murino, tales como aquellas derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EE.UU. Se han descrito también líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Se ensaya en el medio de cultivo en que crecen las células de hibridoma la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, pueden subclonarse los clones mediante procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer mediante procedimientos estándares (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pag. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados con este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía en proteína A-Sepharose o hidroxipatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (p.ej., usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede disponerse en vectores de expresión, que se transfectan entonces en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen proteína inmunoglobulina de otro modo, obteniendo la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Se describirá con más detalle a continuación la producción recombinante de anticuerpos.

En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de colecciones de anticuerpos en fago generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murino y humanos, respectivamente, usando colecciones en fago. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por intercambio de cadena (Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategias para construir colecciones en fago muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN puede modificarse también, por ejemplo, sustituyendo por la secuencia de codificación de dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias de murino homólogas (patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o mediante unión covalente de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos no de inmunoglobulina sustituyen los dominios constantes de un anticuerpo o sustituyen los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo, creando un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

(iii) Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Se hace referencia a menudo a estos residuos aminoácidos no humanos como residuos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede efectuarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo por CDR o secuencias de CDR de roedor las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en que

algunos residuos de CDR, y posiblemente algunos residuos de FR, están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto pesados como ligeros, para usar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el denominado procedimiento de “mejor ajuste”, se criba la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a toda la colección de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que sea más cercana a la del roedor se acepta entonces como región estructural humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de una alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y de diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias original y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los especialistas en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y exhiben las estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, concretamente, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor e importadas de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están implicados directa y más sustancialmente en la influencia de la unión a antígeno.

Los anticuerpos anti-VEGF humanizados y variantes de afinidad madurada de los mismos se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.884.879 expedida el 26 de febrero de 2005.

Ahora es posible producir animales transgénicos (p.ej. ratones) que sean capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de antígeno endógeno. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras exposición a antígeno. Véanse, p.ej., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993) y Duchosal *et al.*, *Nature* 355: 258 (1992).

Como alternativa, puede usarse la tecnología de presentación en fago (McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios génicos del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, se clonan los genes del dominio V de anticuerpo en fase con un gen de proteína de recubrimiento mayoritaria o minoritaria de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una sola copia de ADN monocatenario del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan también como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de los linfocitos B. La presentación en fago puede efectuarse en una variedad de formatos; para su revisión véase, p.ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos del gen V para presentación en fago. Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz variada de anticuerpos antioxazolona a partir de una pequeña colección combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos ante una serie variada de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991) o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905.

Como se discute anteriormente, los anticuerpos humanos pueden generarse también mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.567.610 y 5.229.275).

Se describen anticuerpos monoclonales humanos anti-VEGF en la patente de EE.UU. nº 5.730.977, expedida el 24 de marzo de 1998.

(iv) Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, p.ej., Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las colecciones de anticuerpos en fago discutidas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente formando fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Resultarán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo para el facultativo especialista. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185.

(v) Otras modificaciones de secuencia aminoacídica

Se contemplan la modificación o modificaciones de secuencia aminoacídica de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de la secuencia aminoacídica del anticuerpo introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos en las secuencias aminoacídicas del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios aminoacídicos pueden alterar también los procesos postraduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glucosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", como se describe por Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí se identifican un residuo o un grupo de residuos diana (p.ej., residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones aminoacídicas que demuestren sensibilidad funcional ante las sustituciones se refinan entonces introduciendo más u otras variantes en o por los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia aminoacídica está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la actuación de una mutación en un sitio dado, se realiza el barrido con ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se criba en las variantes de anticuerpo expresadas la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia aminoacídica incluyen fusiones aminoterminal y/o carboxiterna que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen 100 o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples residuos aminoacídicos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo con una enzima (p.ej, ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida sérica del anticuerpo.

Es otro tipo de variante una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes tienen al menos un residuo aminoacídico en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de la FR.

Se logran modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionado sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto polipeptídico en la zona de sustitución, por ejemplo, en conformación de lámina o hélice, (b) de la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) del volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en "Biochemistry", 2ª ed., pág. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H).

Como alternativa, los residuos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;

- (5) residuos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo puede sustituirse también, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir una reticulación aberrante. A la inversa, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo original (p.ej., un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas respecto al anticuerpo original del que se generan. Un modo conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica maduración de la afinidad usando presentación en fago. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (p.ej., 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones amínicas posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se presentan de forma monovalente en partículas de fago filamentosas como fusiones del producto del gen III de M13 empaquetadas en cada partícula. Se criba entonces en las variantes presentadas en fago su actividad biológica (p.ej., afinidad de unión) como se da a conocer en la presente memoria. Para identificar los sitios de región hipervariable candidatos a modificación, puede efectuarse una mutagénesis de barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y VEGF humano. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos a sustitución según las técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez se generan dichas variantes, se somete el panel de variantes a cribado como se describe en la presente memoria y pueden seleccionarse los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

Otro tipo de variante aminoacídica del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende eliminar uno o más restos carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos es típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N hace referencia a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias del triptéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento de la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias triptépticas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación O-ligada hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque pueden usarse también 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia aminoacídica de tal modo que contenga una o más de las secuencias triptépticas anteriormente descritas (para sitios de glicosilación N-ligados). La alteración puede hacerse también mediante la adición o sustitución por uno o más residuos de serina o treonina de la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación O-ligados).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura de carbohidrato madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de EE.UU. nº 2003/0157108 A1, Presta, L. Véase también el documento US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectora en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO03/011878, Jean-Mairet *et al.* y en la patente de EE.UU. nº 6.602.684, Umana *et al.* Se reseñan anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo en el documento WO97/30087, Patel *et al.* Véanse también los documentos WO98/58964 (Raju, S.) y WO99/22764 (Raju, S.) referentes a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc del mismo.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, p.ej., de modo que se potencie la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC en inglés) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC en inglés) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones aminoacídicas en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse un residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de un enlace disulfuro intercatenario en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véanse Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Pueden prepararse también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando reticulantes heterobifuncionales como se describen en Wolff *et al.* *Cancer Research* 53: 2560-

2565 (1993). Como alternativa, puede genomanipularse un anticuerpo para tener regiones Fc duales y puede tener así capacidades de lisis de complemento y ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

5 El documento WO00/42072 (Presta, L.) describe anticuerpos con función ADCC mejorada en presencia de células efectoras humanas, en que los anticuerpos comprenden sustituciones aminoacídicas en la región Fc del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo con ADCC mejorada comprende sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Preferiblemente, la región Fc alterada es una región Fc de IgG1 humana que comprende o consiste en sustituciones en una, dos o tres de estas posiciones. Dichas sustituciones se combinan opcionalmente con una sustitución o sustituciones que aumenten la unión a C1q y/o CDC.

10 Se describen anticuerpos con unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) alteradas en el documento WO99/51642, la patente de EE.UU. n° 6.194.551B1, la patente de EE.UU. n° 6.242.195B1, la patente de EE.UU. n° 6.528.624B1 y la patente de EE.UU. n° 6.538.124 (Idusogie *et al.*). Los anticuerpos comprenden una sustitución aminoacídica en una o más de las posiciones aminoacídicas 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 y/o 334 de la región Fc del mismo (numeración Eu de residuos).

15 Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo, puede incorporarse un epítipo de unión a receptor silvestre al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en la presente memoria, "epítipo de unión a receptor silvestre" hace referencia a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

20 Se describen anticuerpos con unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn) y semividas aumentadas en los documentos WO00/42072 (Presta, L.) y US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Por ejemplo, la región Fc puede tener sustituciones en una o más de las posiciones 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 o 434 (numeración Eu de residuos). La variante de anticuerpo que comprende una región Fc preferida con unión a FcRn mejorada comprende sustituciones aminoacídicas en una, dos o tres de las posiciones 307, 380 y 434 de la región Fc del mismo (numeración Eu de residuos). En una realización, el anticuerpo tiene 307/434 mutaciones.

25 Se contemplan también anticuerpos genomanipulados con tres o más (preferiblemente cuatro) sitios de unión a antígeno funcionales (solicitud de EE.UU. n° US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).

30 Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia aminoacídica del anticuerpo mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia aminoacídica de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de módulo de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

(vi) Inmunoconjugados

35 La invención está relacionada también con inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo descrito en la presente memoria conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (p.ej. una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (concretamente, un radioconjugado).

40 Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos sin unión de toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, α -sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

45 Están disponibles una variedad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

50 Se preparan conjugados de anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína difuncionales tales como propionato de *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados difuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bisazido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)etilendiamina), diisocianatos (tales como tolién-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor diactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.* Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentiainopentaacético marcado con carbono

14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleidos con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en preorientación tumoral, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al sujeto seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente limpiador y la administración entonces de un "ligando" (p.ej. avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (p.ej. un radionucleido).

(vii) Inmunoliposomas

El anticuerpo dado a conocer en la presente memoria puede formularse también como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la materia, tales como se describen en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980) las patentes de EE.UU. n° 4.485.045 y 4.544.545. Se dan a conocer liposomas con tiempo de circulación potenciado en la patente de EE.UU. n° 5.013.556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen los liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido, procurando liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la invención pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin *et al.* *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, está contenido un agente quimioterapéutico en el liposoma. Véase Gabizon *et al.* *J. National Cancer Inst.* 81(19) 1484 (1989).

VIII. ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN Y KITS

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase, una etiqueta y un prospecto. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los envases pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón atravesable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti-VEGF. La etiqueta sobre o asociada al envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas. Además, el artículo de fabricación comprende un prospecto con instrucciones para el uso, incluyendo por ejemplo instruir al usuario de la composición para la administración de la composición de anticuerpo anti-VEGF y un agente quimioterapéutico al sujeto, p.ej., capecitabina, taxano, antraciclina, paclitaxel, docetaxel, partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®), doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida o combinaciones de los mismos. El prospecto puede contener opcionalmente algunos o todos los resultados encontrados en el ejemplo 1.

El antagonista específico de VEGF puede envasarse solo o en combinación con otros compuestos terapéuticos anticancerosos como un kit. El kit puede incluir componentes opcionales que ayuden a la administración de la dosis unitaria a sujetos, tales como viales para reconstituir formas en polvo, jeringuillas para inyección, sistemas de suministro IV a medida, inhaladores, etc. Adicionalmente, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. En ciertas realizaciones, las instrucciones comprenden instrucciones para el uso, incluyendo por ejemplo instruir al usuario de la composición para administrar la composición de anticuerpo anti-VEGF y un agente quimioterapéutico al sujeto, p.ej., capecitabina, taxano, antraciclina, paclitaxel, docetaxel, partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®), doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida o combinaciones de los mismos. Las instrucciones pueden contener opcionalmente algunos o todos los resultados encontrados en el ejemplo 1. El kit puede fabricarse como una dosis unitaria de un solo uso para un sujeto, usos múltiples para un sujeto particular (a una dosis constante o en que los compuestos individuales puedan variar en potencia a medida que avanza la terapia) o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para administración a múltiples sujetos ("envasado a granel"). Los componentes del kit pueden ensamblarse en cartones, envases blíster, botellas, tubos y similares.

Depósito de materiales

La siguiente línea celular de hibridoma se ha depositado según las disposiciones del tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, EE.UU.:

Designación del anticuerpo	Nº ATCC	Fecha de depósito
A4.6.1	ATCC HB-10709	29 de marzo de 1991

El siguiente ejemplo se pretende meramente que ilustre la práctica de la invención y no se proporciona a modo de limitación.

5 EJEMPLO

Ejemplo 1. Bevacizumab en combinación con regímenes de quimioterapia en sujetos con cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado

10 El cáncer de mama metastásico (CMM) es una enfermedad incurable, sucumbiendo la mayoría de los pacientes a la enfermedad al cabo de 2 años desde el diagnóstico (Greenberg, *et al.*, 1996, *J. Clin. Oncol.* 14: 2197-205; Dawood, *et al.*, 2008, *J. Clin. Oncol.* 26: 4891-8 y Chia *et al.*, *Cancer*, 2007, 110: 973-9). De los pacientes que presentan CMM, aproximadamente un 60 % habrá presentado anteriormente enfermedad localizada de la que ha recaído, aproximadamente un 40 % de los pacientes presentará enfermedad metastásica *de novo*.

15 Dos ensayos en fase III aleatorizados anteriores de CMM han demostrado el beneficio de la adición de bevacizumab a la quimioterapia inicial con taxanos. En el ensayo E2100 en fase III crucial, la supervivencia libre de progresión (SLP) era significativamente más larga en pacientes tratados con paclitaxel + bevacizumab semanal que en aquellos tratados con paclitaxel solo (Miller *et al.*, *N. Engl J. Med.*, 2007, 357: 2666-76). De forma similar, el ensayo AVADO, que investigaba la combinación de bevacizumab (a 7,5 y 15 mg/kg q3w) con docetaxel, encontró que los pacientes
20 tratados con docetaxel + bevacizumab tenían una supervivencia libre de progresión (SLP) que era más larga que aquellos tratados con docetaxel solo (Miles *et al.*, 2008 ASCO Annual Meeting Chicago, IL). Anteriormente, un ensayo en fase III aleatorizado (AVF2119g) para CMM anteriormente tratado que evaluaba la combinación de bevacizumab con capecitabina demostró que la tasa de respuesta global (TRG) era mayor en aquellos tratados con
25 capecitabina + bevacizumab que con capecitabina sola, pero no consiguió cumplir su objetivo primario de mejorar la SLP (Miller *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2005, 23: 792-9).

Este ejemplo se refiere al análisis de los resultados obtenidos con sujetos de cáncer de mama metastásico
30 anteriormente no tratado tratados en el ensayo clínico RIBBON 1 usando taxanos y quimioterapias sin taxano. El objetivo primario del estudio era determinar el beneficio clínico de la adición de bevacizumab a regímenes de quimioterapia estándares para cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado, medido por la SLP basada en la valoración del tumor por el investigador. Véanse, p.ej., O'Shaughnessy y Brufsky, (2008), *Clinical Breast Cancer*, 8(4): 370-373. El ensayo comprendía dos grupos de estudio que evaluaban AVASTIN® con diferentes tipos de quimioterapias en mujeres que no habían recibido anteriormente quimioterapia por su cáncer de mama avanzado
35 negativo de HER2. En el primer grupo de estudio, las mujeres recibieron AVASTIN o placebo en combinación con taxano o quimioterapias basadas en antraciclina. En el segundo grupo de estudio, las mujeres recibieron AVASTIN o placebo en combinación con quimioterapia de capecitabina. El análisis de este ejemplo estaba basado en la información de 1237 pacientes. Estos ensayos evaluaban la eficacia de bevacizumab (AVASTIN®) como terapia para pacientes de cáncer de mama metastásico anteriormente no tratado.

40 Diseño del estudio

Se representa en la Figura 1 el diseño del estudio RIBBON1.

45 En el ensayo RIBBON1, se usó el siguiente protocolo de tratamiento:

Rama A: bevacizumab 15 mg/kg IV el día 1 de cada ciclo de 21 días y cualquier cohorte 1, cohorte 2 o cohorte 3;
Rama B: placebo IV el día 1 de cada ciclo de 21 días y cualquier cohorte 1, cohorte 2 o cohorte 3.
Cohorte 1: Cualquiera de los siguientes taxanos administrado cada 3 semanas
50 Docetaxel 75-100 mg/m² IV
Partículas de paclitaxel unidas a proteína (Abraxane®) 260 mg/m² IV
Cohorte 2: Cualquiera de las siguientes quimioterapias de combinación basadas en antraciclina, para sujetos anteriormente no tratados con antraciclinas, cada 3 semanas:
FEC: 5-fluorouracilo 500 mg/m² IV, epirubicina 90-100 mg/m² IV y ciclofosfamida 500 mg/m² IV el día 1
55 FAC: 5-fluorouracilo 500 mg/m² IV, doxorubicina 50 mg/m² IV y ciclofosfamida 500 mg/m² IV el día 1
AC: Doxorubicina 50-60 mg/m² IV y ciclofosfamida 500-600 mg/m² IV el día 1
EC: Epirubicina 90-100 mg/m² IV y ciclofosfamida 500-600 mg/m² IV el día 1
Cohorte 3: Capecitabina 1000 mg/m² por vía oral dos veces al día los días 1-14 de cada ciclo de 3 semanas.

60 Además, después de la fase de tratamiento con anonimato, se procuró a algunos sujetos bevacizumab a 15 mg/kg IV cada tres semanas o 10 mg/ml IV cada 2 semanas; procurados al mismo tiempo que la quimioterapia.

Se suministró bevacizumab (AVASTIN®) en forma de un concentrado líquido estéril de incoloro a marrón pálido de transparente a ligeramente opalescente para solución en infusión IV. Se suministró el bevacizumab en viales de
65 vidrio de 5 ml (100 mg) o 20 ml (400 mg) que contenían 4 ml o 16 ml de bevacizumab, respectivamente (25 mg/ml para cualquier vial). Los viales contienen bevacizumab con fosfato, trehalosa, polisorbato 20 y agua estéril para

inyecciones (SWFI), USP. Los viales no contenían conservante. Se diluyó AVASTIN® en inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP, hasta un volumen final de 100 ml antes de administración intravenosa continua.

Procedimientos

Los sujetos/pacientes elegibles tenían los siguientes criterios de elegibilidad claves: edad > 18 años, ECOG 0 o 1 (escala de estado funcional ECOG), sin quimioterapia anterior por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico, negativos de Her2 (a menos que sean positivos de Her2 y el trastuzumab esté contraindicado o no esté disponible) y/o quimioterapia complementaria anterior permitida si hay recurrencia ≥ 12 meses desde la última dosis. Todos los sujetos tenían adenocarcinoma de mama confirmado histológica o citológicamente, los sujetos pueden haber tenido enfermedad localmente recurrente o metastásica mensurable (por los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST en inglés)) o no mensurable. La enfermedad localmente recurrente no era susceptible de resección con intención curativa.

Los sujetos pueden haber recibido terapia hormonal anterior en el ámbito complementario o metastásico si se ha suspendido 1 semana o más antes del día 0, o quimioterapia complementaria si se ha suspendido 12 meses o más antes del día 0.

Los criterios de exclusión incluían estado positivo de HER2 (a menos que el paciente hubiera evolucionado desde terapia con trastuzumab o la terapia con trastuzumab estuviera contraindicada o no estuviera disponible); quimioterapia complementaria o prequirúrgica anterior en 12 meses; metástasis conocidas en el sistema nervioso central; presión sanguínea > 150/100 mm Hg; angina inestable; insuficiencia cardíaca congestiva (ICG) en grado II o mayor de la Asociación cardíaca de Nueva York; historial de infarto de miocardio en menos de 6 meses; historial de apoplejía o ataque isquémico transitorio en menos de 6 meses; enfermedad vascular periférica clínicamente significativa; evidencias de diátesis hemorrágica o coagulopatía; historial de fístula abdominal, perforación gastrointestinal (GI) o absceso intraabdominal en menos de 6 meses; historial de reacción anafiláctica a terapia con anticuerpo monoclonal no controlada con premedicación; herida grave no curada; funcionamiento orgánico inadecuado; enfermedad localmente recurrente susceptible de resección con intención curativa; historial de otras malignidades en menos de 5 años. Si se elige antraciclina como quimioterapia, los pacientes requerían también tener una fracción de eyección del ventrículo izquierdo ≥ 50 % y sin historial anterior de tratamiento con antraciclina.

Se realizó el ensayo en todo el mundo (al menos 22 países) y acumuló 1237 sujetos/pacientes (taxano (T): 307; antraciclina (antra): 315 y capecitabina (Cap): 615).

El criterio de valoración primario del estudio fue la supervivencia libre de progresión (SLP), definida como el tiempo desde la asignación aleatoria a la progresión de la enfermedad o muerte, basada en la valoración del investigador. Puede usarse la metodología de Kaplan-Meier para estimar la mediana de SLP para cada rama de tratamiento. En ciertas realizaciones, el cociente de riesgos instantáneos para SLP se estimará usando un modelo de regresión Cox estratificado con los mismos factores de estratificación usados en la prueba de rangos logarítmicos estratificados. Se efectúan los análisis de SLP de cada cohorte a nivel de $\alpha = 0,05$ de dos colas. Se comparan los datos de tiempo hasta el evento entre las ramas de tratamiento usando una prueba de rangos logarítmicos estratificada. Se usa el procedimiento de Kaplan-Meier para estimar la duración de los datos de tiempo hasta el evento. Se calculan los intervalos de confianza del 95 % para la mediana de tiempo hasta el evento usando el procedimiento de Brookmeyer-Crowley. Se estiman los HR para los datos de tiempo hasta el evento usando un modelo de regresión Cox estratificado.

Los criterios de valoración secundarios incluían la tasa de respuesta objetiva (TRO), tasa de supervivencia a un año, supervivencia global (SG) y SLP basada en la valoración del CRI y la seguridad. La SG se define como el tiempo desde la asignación aleatoria hasta la muerte por cualquier causa. La TRO se define como el porcentaje de pacientes que consiguieron una remisión completa o parcial confirmada ≥ 28 días después de la documentación de respuesta inicial. La tasa de supervivencia a un año se valora entre las ramas de tratamiento usando el procedimiento de aproximación normal. Se compara la TRO en pacientes con enfermedad mensurable en la situación inicial usando la prueba χ^2 de Mantel-Haenszel estratificada. Se incluyen los factores de estratificación por asignación aleatoria en todos los análisis estratificados.

Resultados

El RIBBON1 era un estudio clínico internacional, multicéntrico, con asignación aleatoria, con doble anonimato y controlado por placebo que inscribió a 1.237 sujetos/pacientes con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico negativo de HER2 que no habían recibido quimioterapia por su enfermedad metastásica. Véase la Tabla 1 para las características del sujeto/paciente del ensayo. El criterio de valoración primario de estos ensayos era la supervivencia libre de progresión (SLP), definida como el tiempo desde la asignación aleatoria hasta la progresión de la enfermedad o muerte, basado en la valoración del investigador. Los resultados del ensayo indican que AVASTIN® en combinación con las siguientes quimioterapias usadas para cáncer de mama metastásico de primera línea negativo de HER2 aumentaba el tiempo que las mujeres vivían sin avance de la enfermedad, como se

define por el criterio de valoración primario de supervivencia libre de progresión (SLP), en comparación con las quimioterapias solas.

Tabla 1: Característica del sujeto/paciente

	Cap		T/antra	
	PL (n= 206)	BV (n= 409)	PL (n= 207)	BV (n= 415)
Mediana de edad, años	57	56	55	55
ECOG PS 0	53	52	53	52
HR positivo	71	76	74	74
Triple negativo	24	21	22	23
Libre de enfermedad ≤ 12 meses	22	27	41	37
Terapia complementaria	76	70	47	45
Taxano	41	39	15	15
Antraciclina	69	60	30	30
≥ 3 sitios metastásicos	45	43	45	45
Dx mensurable	78	80	86	83

Los resultados de este estudio en fase III proporcionan un apoyo directo al uso de agentes antiangiogénicos como terapia de primera línea para pacientes con cáncer de mama no tratado anteriormente. La adición de bevacizumab, un anticuerpo anti-VEGF, a la quimioterapia de terapia de taxano (p.ej., docetaxel o partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®))/terapia de antraciclina (p.ej., doxorubicina, epirubicina o combinaciones de los mismos) o terapia de capecitabina confirió una mejora clínicamente relevante y estadísticamente significativa a los pacientes de cáncer de mama medida, por ejemplo, mediante la supervivencia libre de progresión. La mediana de SLP en meses (IC del 95 %) es de 9,2 meses (8,6, 10,1) en los pacientes tratadas con bevacizumab y terapia de taxano (p.ej., docetaxel o partículas de paclitaxel unidas a proteína (p.ej., Abraxane®))/terapia de antraciclina (p.ej., doxorubicina, epirubicina o combinaciones de los mismos) en comparación con 8,0 meses (6,7, 8,4) en la terapia de taxano/antraciclina sin bevacizumab, con un HR (IC del 95 %) de 0,644 (0,522, 0,795) y un valor de p (rango logarítmico) menor de 0,0001. Véase la Tabla 2. Véase la figura 3 para ver los valores de SLP determinados por el investigador (INV) y los valores de SLP determinados por el comité de revisión independiente (CRI). La mediana de SLP en meses (IC del 95 %) es de 8,6 meses (8,1, 9,5) en los pacientes tratados con bevacizumab y capecitabina, en comparación con 5,7 meses (4,3, 6,2) en terapia de capecitabina sin bevacizumab, con un HR (IC del 95 %) de 0,688 (0,564, 0,840) y un valor de p (rango logarítmico) de 0,0002. Véase la tabla 2. Véase la Figura 2 para ver los valores de SLP determinados por el investigador (INV) y los valores de SLP determinados por el comité de revisión independiente (CRI). Véase la Tabla 3 para los criterios de valoración secundarios, en que se divide la SLP por subgrupos de quimioterapia. Véanse las Figuras 4 y 6 para análisis de subgrupos de SLP por diversas cohortes, p.ej., capecitabina y T/antraciclina en la Figura 4 y T/antraciclina en la Figura 6. Véase la Figura 5 para la tasa de respuesta objetiva (TRO) y la Tabla 2. Entre los pacientes que responden, la duración mediana de la repuesta objetiva era más larga en las ramas de bevacizumab para ambas cohortes: cohorte de capecitabina, 9,2 meses (IC del 95 %: 8,5-10,4) frente a 7,2 meses (IC del 95 %: 5,1-9,3) y para cohorte de taxano/antraciclina, 8,3 meses (IC del 95 %: 7,2-10,7) frente a 7,1 meses (IC del 95 %: 6,2-8,8). Véase la Tabla 4 para los detalles de supervivencia global. No hay una señal de aviso inesperada. La seguridad era consistente con los resultados de ensayos de bevacizumab anteriores. Véase la Tabla 5 para el sumario de seguridad. Esta mejora es clínicamente relevante.

Tabla 2 SLP y SG

	T/antra n= 622		Cap = 615	
	pl n= 207	B n= 415	pl n= 206	B N= 409
SLP (HR, IC del 95 %)	0,644 (0,522, 0,795)		0,688 (0,564-0,840)	
Valor de p (rango logarítmico)	< 0,0001		0,0002	
Mediana (meses)	8,0	9,2	5,7	8,6
TRO (%)	67 (37,9 %)	177 (51,3 %)	38 (23,6 %)	115 (35,4 %)
Valor de p	0,0054		0,0097	
SG (HR, IC del 95 %)	1,032 (0,774, 1,376)		0,847 (0,631, 1,138)	
Valor de p (rango logarítmico)	0,8298		0,2706	
Mediana (meses)	23,8	25,2	21,2	29,0
HR= cociente de riesgos instantáneos				

Tabla 3. Criterio de valoración secundario: SLP por subgrupos de quimioterapia (SLPm= mediana de SLP)

	Taxano		Antra	
	PL (n= 104)	BV (n= 203)	PL (n= 103)	BV (n= 212)

LPSm, meses	8,2	9,2	7,9	9,2
HR (IC del 95 %)	0,75 (0,56-1,01)		0,55 (0,40-0,74)	
Valor de p	0,0547		< 0,0001	

Tabla 4. Supervivencia global

	Cap		T/antra	
	PL (n= 206)	BV (n= 409)	PL (n= 207)	BV (n= 415)
% de muertes	35	30	35	34
Mediana de SG, meses	21,2	29,0	23,8	25,2
HR (IC del 95 %)	0,85 (0,63-1,14)		1,03 (0,77-1,38)	
Valor de p	0,27		0,83	
Tasa de supervivencia a 1 año (%)	74	81	83	81
Valor de p	0,076		0,44	

5

Tabla 5: Sumario de seguridad

Evento (%)	Cape		Taxano		Antra	
	PL (n= 201)	BV (n= 404)	PL (n= 202)	BV (n= 203)	PL (n= 100)	BV (n= 210)
AA* seleccionados	9,0	22,0	22,5	43,8	16,0	28,1
AAG	18,9	24,3	26,5	41,4	16,0	22,4
AA que conducen a la suspensión del estudio del fármaco (PL o BV)	11,9	11,9	7,8	24,1	4,0	14,3
AA que conducen a la muerte**	2,5	2,0	2,9	3,4	3,0	1,4
*Acontecimientos adversos (AA) que se ha mostrado anteriormente que estaban relacionados con bevacizumab						
**Excluye AA relacionados con la progresión del cáncer de mama metastásico						
AAG: acontecimientos adversos graves						

La adición de bevacizumab a regímenes de quimioterapia basados en capecitabina, taxano o antraciclina usados en el tratamiento de primera línea de cáncer de mama metastásico daba como resultado una mejora estadísticamente significativa de la SLP con un perfil de seguridad comparable con estudios de fase III anteriores.

10

Listado de secuencias

- 15 <110> GENENTECH, INC. *et al.*
 <120> TERAPIA ANTANTIOTÉGICA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA
 <130> P4331R1 WO
 <141> 20-11-2009
 <150> US 61/117.102
 <151> 22-11-2008
 20 <150> US 61/178.009
 <151> 13-05-2009
 <150> US 61/179.307
 <151> 18-05-2009
 <160> 2
 25 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> la secuencia se sintetiza
 <400> 1

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

Val Ser Ser

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia se sintetiza

<400> 2

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

Ile Lys Arg

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-VEGF para uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer de mama localmente recurrente o metastásico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto un régimen de tratamiento que comprende una cantidad eficaz de al menos un producto quimioterapéutico y un anticuerpo anti-VEGF, en el que dicho sujeto no ha recibido ninguna quimioterapia por cáncer de mama localmente recurrente o metastásico, y/o no ha recibido quimioterapia complementaria anterior por recurrencia en 12 meses o menos desde la última dosis; y en el que la quimioterapia del régimen de tratamiento comprende la administración de FEC: 5-fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida o FAC: 5-fluorouracilo, doxorubicina y ciclofosfamida o AC: doxorubicina y ciclofosfamida o EC: epirubicina y ciclofosfamida; y en el que el régimen de tratamiento alarga eficazmente la supervivencia libre de progresión del sujeto.
2. El anticuerpo anti-VEGF de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709.
3. El anticuerpo anti-VEGF de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo humanizado.
4. El anticuerpo anti-VEGF de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
5. El anticuerpo anti-VEGF de la reivindicación 1, en el que el sujeto es negativo de HER2.
6. El anticuerpo anti-VEGF de la reivindicación 4, en el que la administración de bevacizumab es 15 mg/kg IV el día 1 de cada ciclo de 21 días, y la quimioterapia es FEC: 5-fluorouracilo que se administra a 500 mg/m² IV, epirubicina que se administra a 90-100 mg/m² IV y ciclofosfamida que se administra a 500 mg/m² IV el día 1, o FAC: 5-fluorouracilo que se administra a 500 mg/m² IV, doxorubicina que se administra a 50 mg/m² IV y ciclofosfamida que se administra a 500 mg/m² IV el día 1, o AC: doxorubicina que se administra a 50-60 mg/m² IV y ciclofosfamida que se administra a 500-600 mg/m² IV el día 1 o EC: epirubicina que se administra a 90-100 mg/m² IV y ciclofosfamida que se administra a 500-600 mg/m² IV el día 1 cada tres semanas.
7. El anticuerpo anti-VEGF de la reivindicación 1, en el que el régimen de tratamiento alarga la supervivencia libre de progresión del sujeto en al menos aproximadamente 1 mes o más cuando se compara con otro sujeto tratado con la quimioterapia sola.
8. El anticuerpo anti-VEGF de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-VEGF tiene una región variable de cadena pesada que comprende la siguiente secuencia aminoacídica:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW

INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP

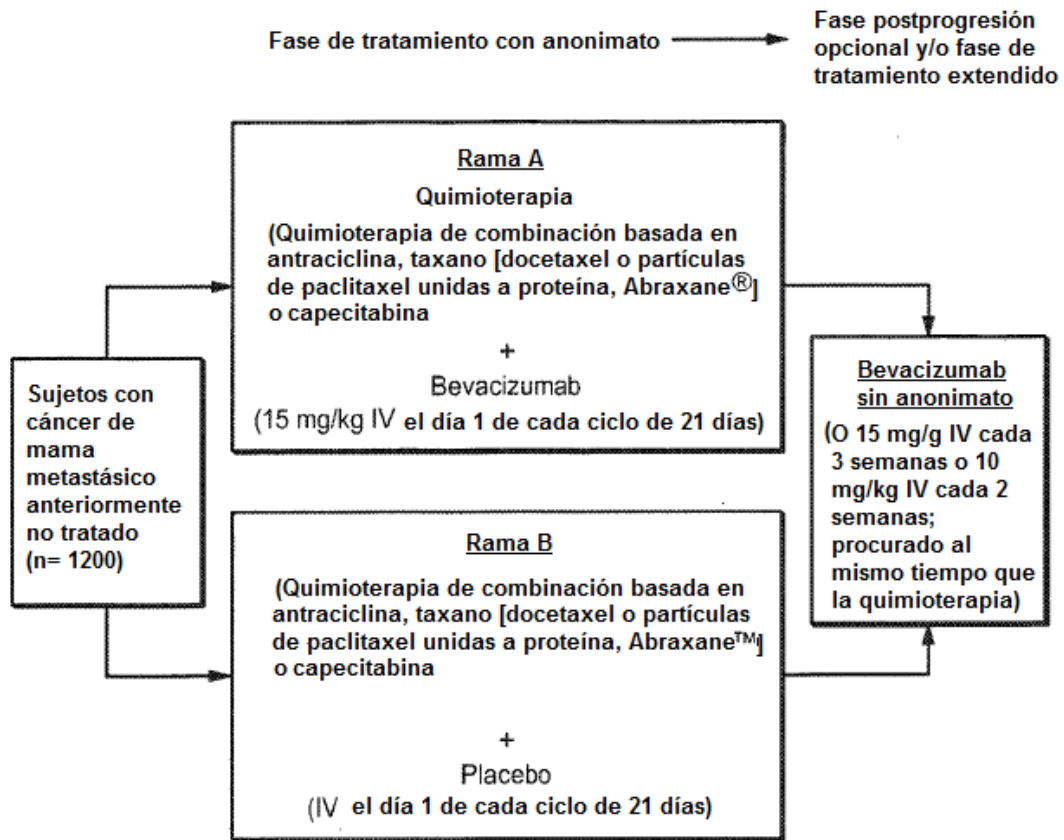
HYYGSSHWYF DVWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO.1)

y una región variable de cadena ligera que comprende la siguiente secuencia aminoacídica:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF

TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ

GTKVEIKR (SEQ ID NO.2).



Cohorte 1: Cualquiera de los siguientes taxanos administrados cada 3 semanas:

Docetaxel 75-100 mg/m² IV

Partículas de paclitaxel unidas a proteína (Abraxane®) 260 mg/m² IV

5 **Cohorte 2:** Cualquiera de las siguientes quimioterapias de combinación basadas en antraciclina, para sujetos anteriormente no tratados con antraciclinas, cada 3 semanas

FEC: 5-fluorouracilo 500 mg/m² IV, epirubicina 90-100 mg/m² IV y ciclofosfamida 500 mg/m² IV el día 1

FAC: 5-fluorouracilo 500 mg/m² IV, doxorubicina 50 mg/m² IV y ciclofosfamida 500 mg/m² IV el día 1

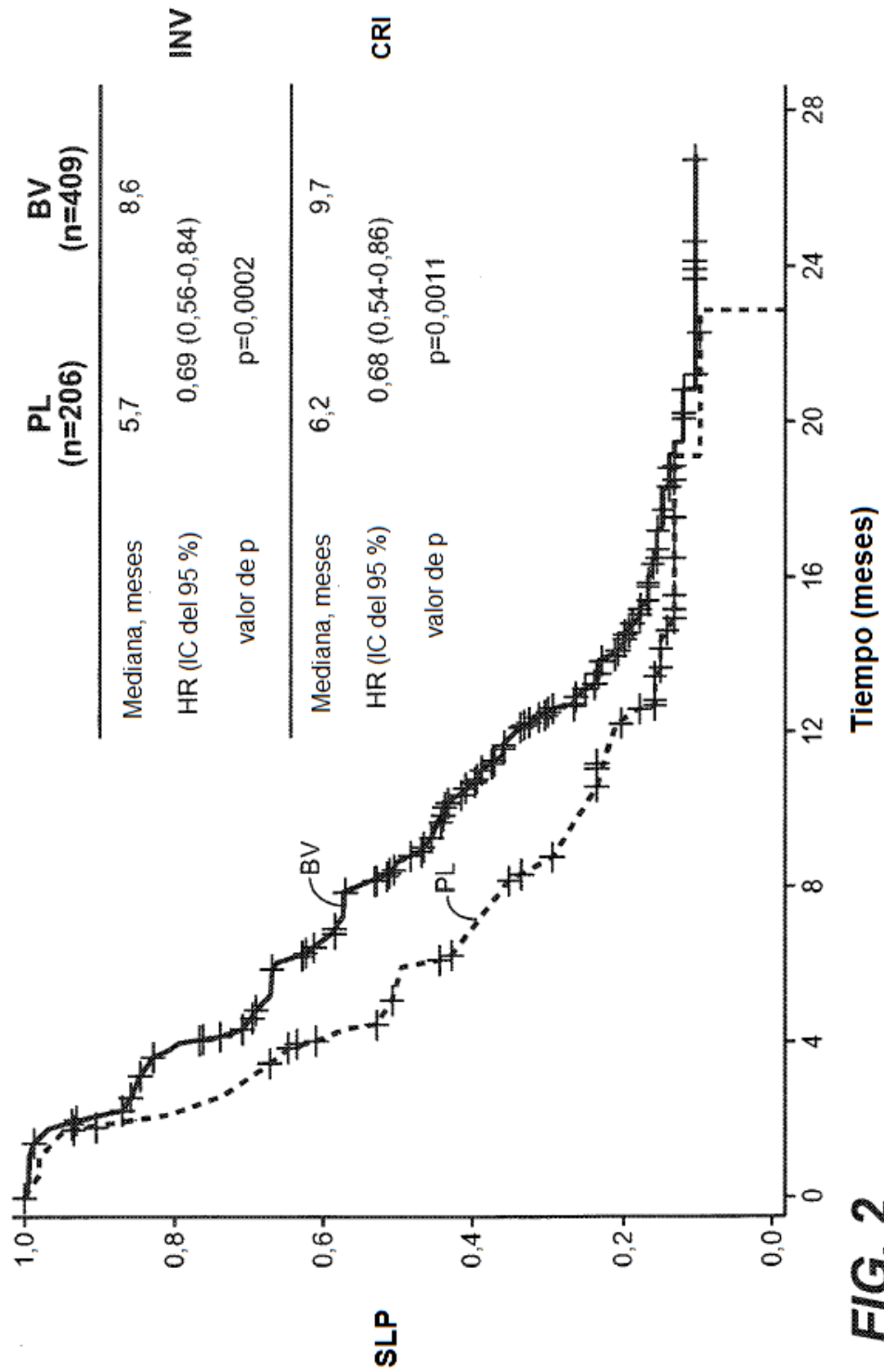
AC: Doxorubicina 50-60 mg/m² IV y ciclofosfamida 500-600 mg/m² IV el día 1

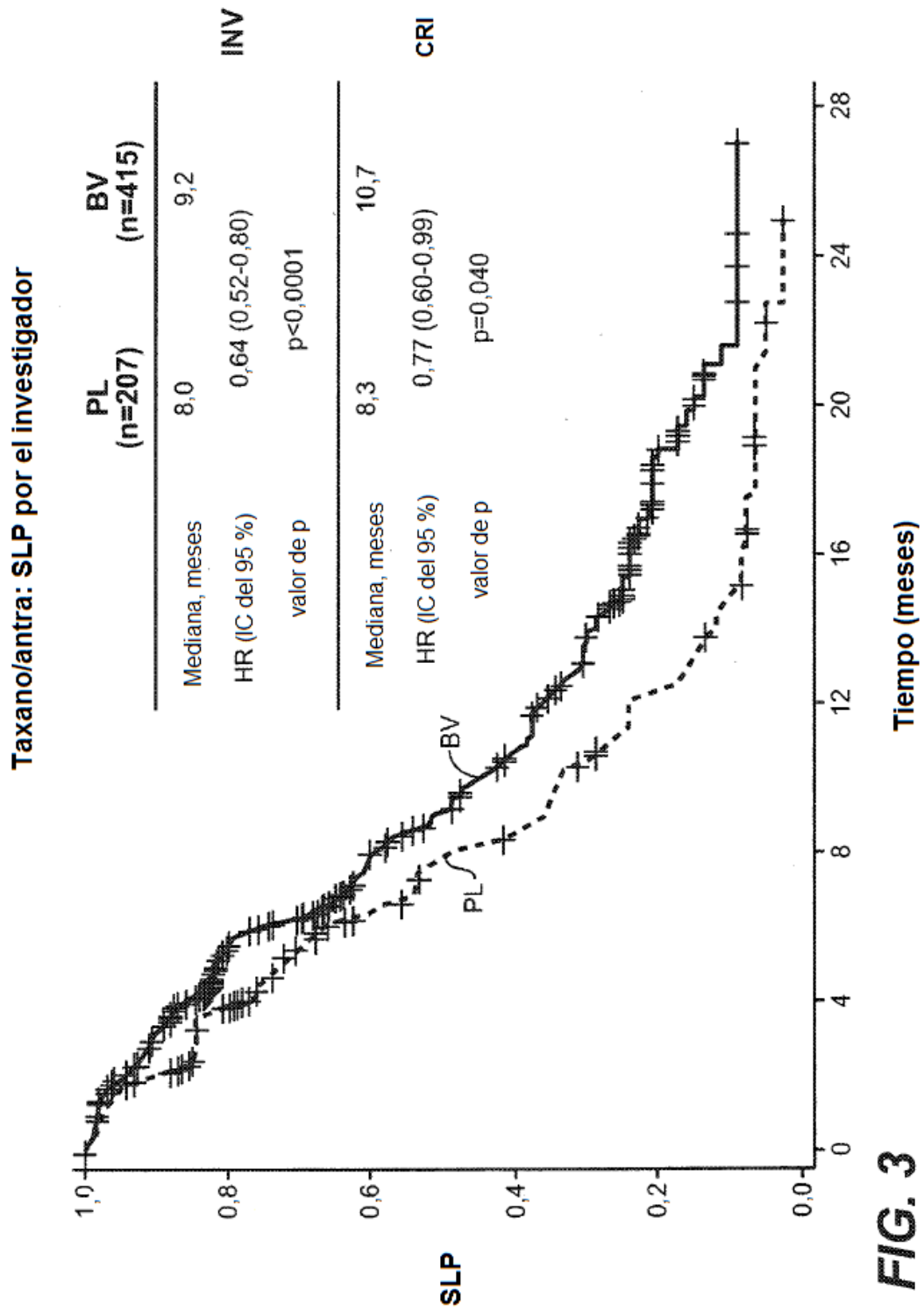
10 EC: Epirubicina 90-100 mg/m² IV y ciclofosfamida 500-600 mg/m² IV el día 1

Cohorte 3: Capecitabina 1000 mg/m² IV por vía oral dos veces al día los días 1-14 de cada ciclo de 3 semanas

FIG. 1

Capecitabina: SLP por el investigador





Análisis de subgrupos de las cohortes de SLP, Cape y T/Antra

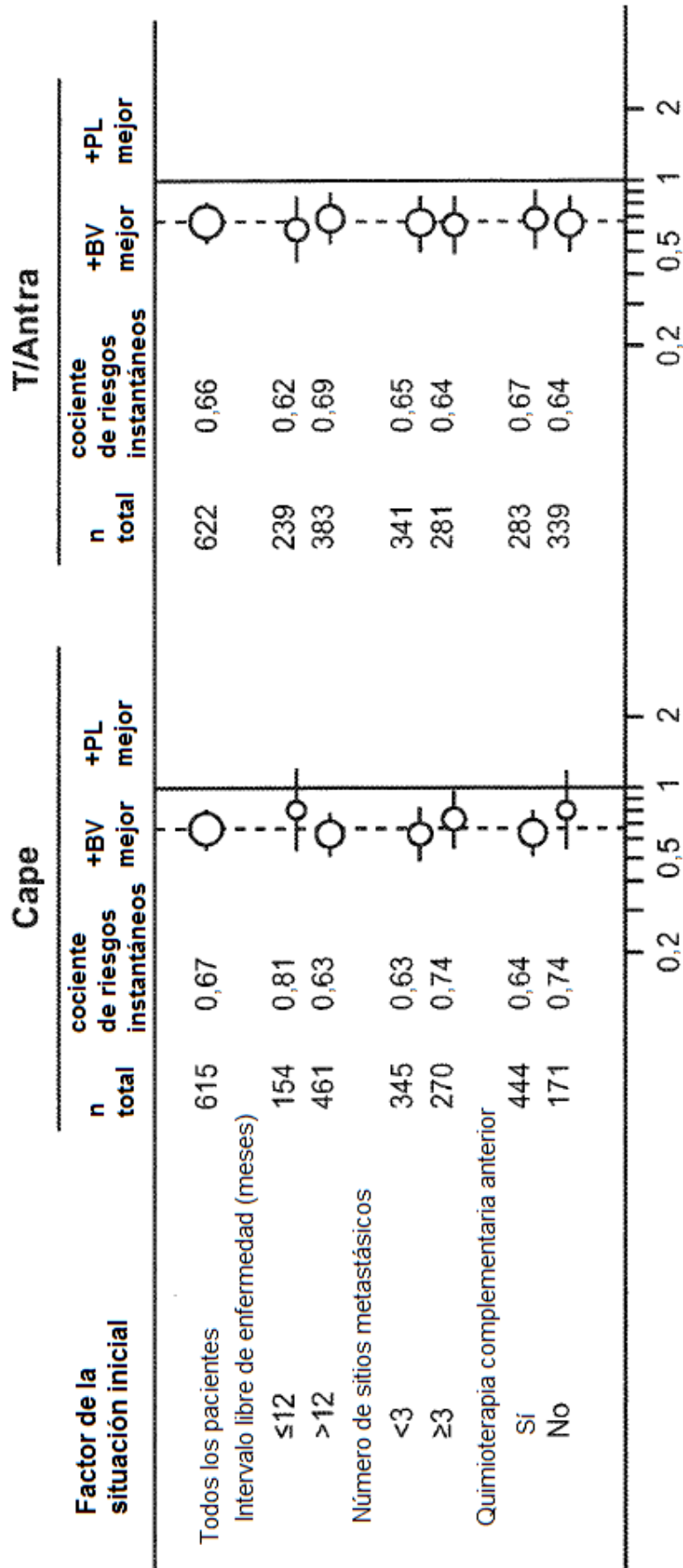
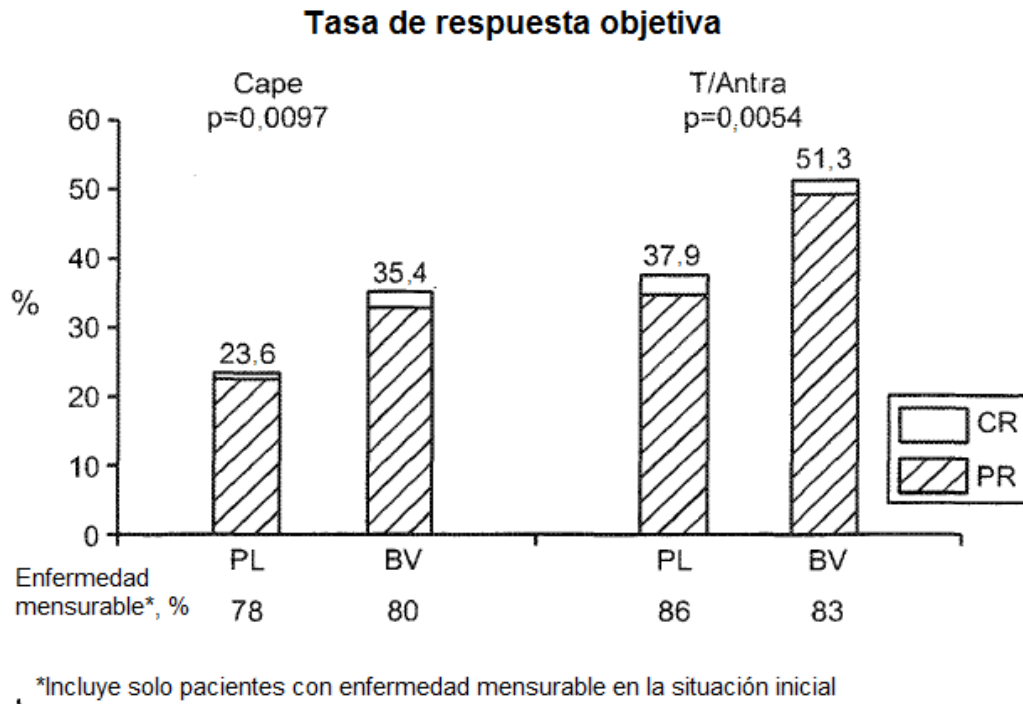
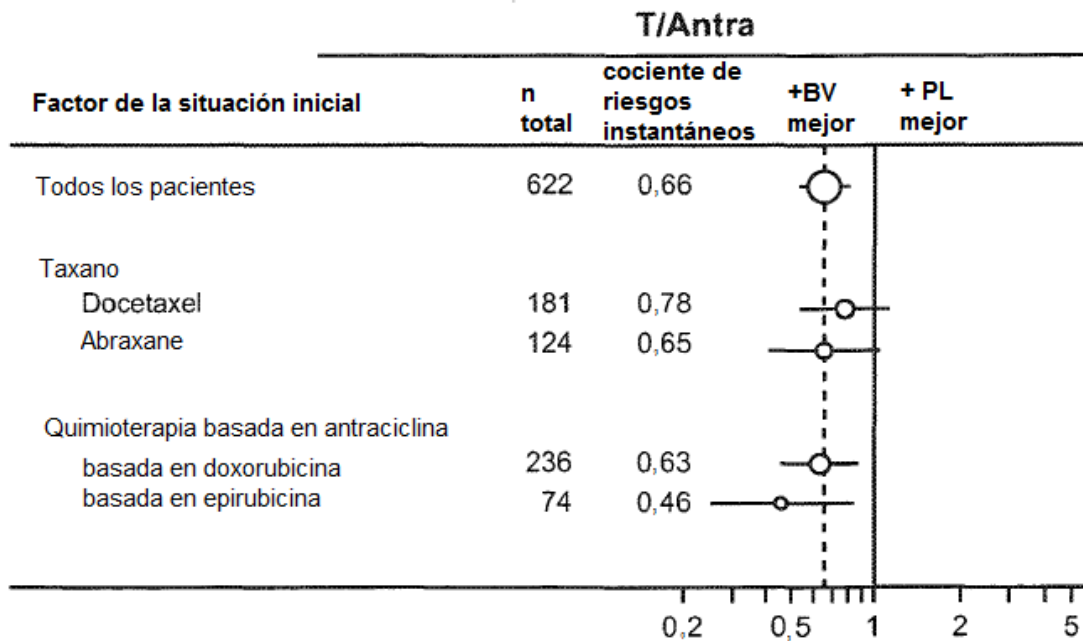


FIG. 4

**FIG. 5****Análisis de subgrupo de las cohortes de T/antra en SLP****FIG. 6**