

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 066**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2007** **E 11193793 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015** **EP 2441472**

54 Título: **Terapia tumoral con un anticuerpo anti-VEGF**

30 Prioridad:

21.08.2006 EP 06017330

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

18.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FRIESS, THOMAS;
HASMANN, MAX y
SCHEUER, WERNER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 546 066 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

Terapia tumoral con un anticuerpo anti-VEGF.

- 5 La presente invención se refiere al tratamiento de un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente con un anticuerpo anti-VEGF durante o después del tratamiento con un anticuerpo anti-HER2.

Antecedentes de la invención

- 10 La angiogénesis ha sido implicada en la patogénesis de una diversidad de trastornos, entre ellos los tumores sólidos, los síndromes neovasculares intraoculares, tales como las retinopatías proliferativas o la degeneración macular relacionada con la edad (DME), la artritis reumatoide y la psoriasis (Folkman *et al.*, J. Biol. Chem. 267:10931-10934; Klagsbrun *et al.*, Annu. Rev. Physiol. 53:217-239, 1991; y Garner A., Vascular diseases, en: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G. K. (editores), 2a edición, Marcel Dekker, New York, páginas 1625 a 1710, 1994). En el caso de los tumores sólidos, la neovascularización permite que las células tumorales adquieran una ventaja de crecimiento y autonomía de proliferación en comparación con las células normales. De acuerdo con lo anterior, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones de tumor y la supervivencia del paciente con cáncer de mama, así como en algunos otros tumores (Weidner *et al.*, N. Engl. J. Med. 324:1-8, 1991; Horak *et al.*, Lancet 340:1120-1124, 1992; y Macchiarini *et al.*, Lancet 340:145-146, 1992).

- 25 El factor de crecimiento endotelial vascular (por sus siglas en inglés, VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) participa en la regulación de la angiogénesis normal y anormal y en la neovascularización asociada a tumores y trastornos intraoculares (Ferrara *et al.*, Endocr. Rev. 18:4-25, 1997; Berkman *et al.*, J. Clin. Invest. 91:153-159, 1993; Brown *et al.*, Human Pathol. 26:86-91, 1995; Brown *et al.*, Cancer Res. 53:4727-4735, 1993; Mattern *et al.*, Brit. J. Cancer. 73:931-934, 1996, y Dvorak *et al.*, Am. J. Pathol. 146:1029-1039, 1995). Los anticuerpos neutralizadores anti-VEGF suprimen el crecimiento de una diversidad de líneas celulares tumorales humanas en ratones (Kim *et al.*, Nature 362:841-844, 1993; Warren *et al.*, J. Clin. Invest. 95:1789-1797, 1995; Borgstrom *et al.*, Cancer Res. 56:4032-4039, 1996, y Melnyk *et al.*, Cancer Res. 56:921-924, 1996). Los documentos nº WO 94/10202, nº WO 98/45332, nº WO 2005/00900 y nº WO 00/35956 se refieren a anticuerpos contra VEGF. El anticuerpo monoclonal humanizado bevacizumab (comercializado bajo el nombre comercial Avastin®) es un anticuerpo anti-VEGF utilizado en la terapia tumoral y es el único agente antiangiogénico aprobado para el tratamiento del cáncer (documento nº WO 98/45331).

- 35 HER2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano y presenta actividad de proteína quinasa en su dominio citoplasmático. HER2 se sobreexpresa en células tumorales y se correlaciona con un pronóstico y supervivencia pobres. Por lo tanto, HER2 es una diana valiosa de la terapia del cáncer de mama. Los anticuerpos contra HER2 son conocidos de Takai N. *et al.*, Cancer 104:2701-2708, 2005; Yeon C.H. *et al.*, Invest New Drugs 23:391-409, 2005; Wong W.M. *et al.*, Cancer Pract. 7:48-50, 1999; Albanell J. *et al.*, Drugs Today (Barc.) 35:931-46, 1999.

- 45 El trastuzumab (comercializado bajo el nombre comercial Herceptin®) es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado recombinante utilizado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico con HER2 sobreexpresado/gen HER2 amplificado. Los estudios preclínicos demuestran que el anticuerpo presenta actividad antitumoral *in vivo* e *in vitro*. Además, se observó un incremento aditivo o sinérgico de la actividad antitumoral del trastuzumab en combinación con diversos agentes antitumorales en modelos de ratón. En estudios clínicos, se observó una extensión de la supervivencia en pacientes de cáncer de mama metastásico sobreexpresante de HER2.

- 50 El documento nº WO 2005/012531 describe anticuerpos que pueden combinarse con anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo Herceptin® también conocido como trastuzumab) y/o un anticuerpo anti-VEGF (por ejemplo Avastin®, también conocido como bevacizumab) en el tratamiento del cáncer colorrectal, cáncer de mama metastásico y cáncer renal. Según el documento nº WO 2005/063816, los anticuerpos anti-VEGF pueden combinarse con los anticuerpos anti-ErbB en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Según el documento nº WO 98/45331, la eficacia de un anticuerpo anti-VEGF en la prevención o el tratamiento de la enfermedad puede mejorarse mediante la administración del anticuerpo en serie o en combinación con otro agente que resulta eficaz para dichos fines, tal como un anticuerpo capaz de unirse al receptor de HER2. Los documentos nº WO 2005/00090 y nº WO 2003/077841 dan a conocer también la combinación de anticuerpos anti-VEGF con anticuerpos anti-ErbB2 para la terapia tumoral. Pegram M.D. *et al.*, Seminars in Oncology 29:29-37, 2002, se refieren a la combinación de anticuerpos anti-ErbB2 con anticuerpos anti-VEGF en la terapia del cáncer de mama.

- 60 Los oncólogos clínicos concuerdan en que el fracaso del tratamiento del cáncer no está causado necesariamente por el crecimiento del tumor primario, que generalmente se trata utilizando cirugía, sino por la extensión metastásica a diferentes órganos. La regresión de los tumores primarios con diferentes fármacos citotóxicos no siempre es indicativa de actividad antimetastásica *per se*. Por el contrario, la metástasis incrementada ha sido observada en respuesta a varios fármacos anticáncer (Geldof *et al.*, Anticancer Res. 8:1335-40, 1988; Murphy J., Clin. Oncol. 11:199-201, 1993, y De Larco *et al.*

Estas actividades antimetastásicas pueden evaluarse, por ejemplo, mediante el método según Schneider T. *et al.*, Clin. Exp. Metas. 19:571-582, 2002.

5 Descripción resumida de la invención

La invención proporciona la utilización de un anticuerpo anti-VEGF para la preparación de un medicamento, tal como se define en las reivindicaciones.

10 La invención proporciona además un anticuerpo anti-VEGF para la utilización según se define en las reivindicaciones.

Preferentemente dicho anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítipo que el bevacizumab.

15 Preferentemente dicho anticuerpo anti-VEGF es el bevacizumab.

Preferentemente dicho anticuerpo anti-HER2 es el trastuzumab.

20 En una realización preferente, la invención se refiere a la coadministración de dicho anticuerpo anti-VEGF y dicho anticuerpo anti-HER2 en el paciente.

Descripción detallada de la invención

25 El término "VEGF" según la invención se refiere al factor de crecimiento celular endotelial vascular (Swiss-Prot nº P 15692), formas de procesamiento alternativo (ver, por ejemplo, Leung *et al.*, Science 246:1306-1309, 1989, y Houck *et al.*, Mol. Endocrin. 5:1806-14, 1991, y fragmentos activos, preferentemente fragmentos N-terminales, de las mismas.

30 La expresión "anticuerpo anti-VEGF" según la invención es un anticuerpo que se une específicamente a VEGF y muestra una actividad antiangiogénica. El anticuerpo anti-VEGF humanizado preferente o anticuerpo anti-VEGF variante en la presente memoria se une a VEGF humano con un valor de Kd no superior a 1×10^{-8} M y preferentemente no superior a aproximadamente 5×10^{-9} M. Preferentemente, el anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante (bevacizumab) generado según Presta *et al.*, Cancer Res. 57:4593-4599, 1997. Un anticuerpo preferente es el bevacizumab. Los anticuerpos anti-VEGF y los métodos para su preparación se describen en, por ejemplo, la patente nº US 6.054.297, el documento nº US2003/0190317, las patentes nº US 6.632.926, nº US 6.884.879 y el documento nº US 2005/0112126.

40 El bevacizumab comprende regiones marco de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de complementariedad ligantes de antígeno de un anticuerpo monoclonal anti-VEGF murino que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93% de la secuencia de aminoácidos del bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones marco, se derivan de la IgG1 humana, y aproximadamente el 7% de la secuencia se deriva del anticuerpo murino A4.6.1. El bevacizumab presenta una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons y está glucosilado. El bevacizumab y su método de preparación se describen en la patente nº EP 1325932.

50 El término "HER2" según la invención se refiere al receptor del factor de crecimiento de 185 kDa también denominado neu y c-erbB-2 (Slamon *et al.*, Science 235:177-182, 1987; Swiss-Prot P04626) cuya función se relaciona con la transformación neoplásica en células de cáncer de mama humanas. La sobreexpresión de esta proteína ha sido identificada en 20% a 30% de los pacientes de cáncer de mama, en los que se correlaciona con enfermedad regionalmente avanzada, una probabilidad incrementada de recurrencia tumoral y una supervivencia reducida del paciente. Hasta 30%-40% de los pacientes que presentan cáncer gástrico, endometrial, de las glándulas salivares, pulmonar de células no pequeñas, pancreático, ovárico, peritoneal, prostático o colorrectal, también pueden mostrar sobreexpresión de dicha proteína.

55 La expresión "anticuerpo anti-HER2" según la invención es un anticuerpo que se une específicamente al mismo epítipo de HER2 que el anticuerpo anti-HER2 murino 4D5 descrito en Hudziak *et al.*, Mol. Cell. Biol. 9:1165-1172, 1989. Los anticuerpos anti-HER2 que se unen al "epítipo 4D5 de HER2", incluyendo el anticuerpo anti-HER2 4D5 mismo, y métodos para su preparación se describen en, por ejemplo, la patente nº US 6.054.297, el documento nº WO 89/06692, las patentes nº US 6.399.063, nº US 6.165.464, nº US 6.054.297, nº US 5.772.997, los documentos nº WO 2003/087131, nº WO 01/00245, nº WO 01/00238, nº WO 00/69460, nº WO 99/31140 y nº WO 98/17797. En una realización preferente de la invención, el anticuerpo anti-HER2 es el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado recombinante (una versión humanizada del anticuerpo anti-HER2 murino 4D5, denominado rhuMab HER2 o trastuzumab) que ha sido clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastásico sobreexpresantes de HER2 que han recibido terapia anticáncer previa extensiva (Baselga *et al.*, J. Clin. Oncol. 14:737-744, 1996). El trastuzumab y su método de preparación se describen en la patente nº EP 590058.

El "epítopo 4D5" es la región en el dominio extracelular de ErbB2 al que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC nº CRL 10463). Dicho epítopo se encuentra próximo a la región transmembranal de ErbB2. Para cribar para anticuerpos que se unen al epítopo 4D5, puede llevarse a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado, tal como el descrito en
 5 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow y David Lane, 1988. Alternativamente, puede llevarse a cabo un mapeado de epítopos para evaluar si el anticuerpo se une al epítopo 4D5 de ErbB2.

El término "epítopo" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos habitualmente consisten de agrupamientos en superficie de
 10 moléculas químicamente activos, tales como aminoácidos o cadenas laterales sacáridas y habitualmente presentan características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros pero no a los segundos se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes. Dependiendo del tamaño del antígeno al que pertenece el epítopo, puede encontrarse disponible más de un epítopo por cada antígeno, resultando de manera
 15 similar en la posibilidad de más de un sitio de unión de anticuerpo (=epítopo) por antígeno.

Los anticuerpos pueden generarse contra, por ejemplo, polipéptidos humanos, de ratón o de rata. Los anticuerpos, policlonales o monoclonales, que reconocen específicamente el antígeno diana se encuentran comprendidos en la invención. Dichos anticuerpos se generan utilizando técnicas inmunológicas estándares conocidas por el experto en
 20 la materia. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales o pueden producirse recombinantemente, tal como un anticuerpo humanizado. La determinación de si un anticuerpo no se une al mismo epítopo que un anticuerpo terapéutico conocido puede determinarse fácilmente en un sistema de ensayo competitivo.

El posible solapamiento de epítopos de dos anticuerpos que se unen al mismo antígeno diana puede detectarse con ayuda de un sistema de ensayo competitivo. Con este fin, por ejemplo con ayuda de un inmunoensayo enzimático, se somete a ensayo el grado en que el nuevo anticuerpo compite con el anticuerpo conocido para la unión a un
 25 antígeno diana inmovilizado. Con este fin, un antígeno diana apropiadamente inmovilizado se incuba con el anticuerpo conocido en forma marcada y un exceso del anticuerpo en cuestión. Mediante la detección del marcaje unido puede determinarse fácilmente el grado en que el anticuerpo en cuestión puede desplazar el anticuerpo conocido del sitio de unión (=epítopo). En caso de un desplazamiento superior a 10%, preferentemente superior a 20%, a la misma concentración o a concentraciones más altas, preferentemente en el caso de un exceso de 10^5
 30 veces del anticuerpo en cuestión, referido al anticuerpo conocido, se encuentra presente un solapamiento de epítopos. Lo anterior significa que el anticuerpo en cuestión se une al mismo epítopo que el anticuerpo conocido.

La expresión "antígeno diana" se refiere a una biomolécula que se une a su anticuerpo terapéutico correspondiente. A título de ejemplo, el antígeno diana de un anticuerpo terapéutico contra HER2 (=ErbB2 o p185^{neu}) como Herceptin® u Omnitarg®, es HER2; de un anticuerpo terapéutico contra FCEr, tal como Erbitux®, es FCEr; y de un anticuerpo terapéutico contra VEGF, tal como Avastin®, es VEGF. El antígeno diana puede ser un antígeno diana soluble, es decir, secretado o desprendido, o un antígeno diana unido a la membrana (celular).
 35 40

Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la materia. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como las aplicaciones prácticas y procedimientos, se resumen en libros de texto relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados, Tijssen P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, en: Practice and theory of enzyme immunoassays, editores R.H. Burdon and v.P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam 1990, páginas 221 a 278, y diversos volúmenes de Colowick S.P. y Caplan N.O. (editores), Methods in Enzymology, Academic Press, referidos a métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.
 45

El término "sobrexpresión" de la proteína receptora de HER2 pretende indicar un nivel anormal de expresión de la proteína receptora de HER2 en una célula de un tumor dentro de un tejido u órgano específico del paciente respecto al nivel de expresión en una célula normal procedente de dicho tejido u órgano. Los pacientes que presentan un cáncer caracterizado por la sobreexpresión del receptor de HER2 pueden determinarse mediante ensayos conocidos de la técnica. Preferentemente la sobreexpresión se mide en células fijas de secciones de tejido congeladas o incluidas en parafina, utilizando la detección inmunohistoquímica (IHQ). En el caso de que se
 50 empareje con la tinción histológica, podrá determinarse la localización de la proteína diana y puede medirse el grado de su expresión dentro de un tumor, tanto cualitativa como semicuantitativamente. Dichos ensayos IHQ de detección son conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen el ensayo de estudio clínico (EEC), el ensayo disponible comercialmente LabCorp 4D5 y el comercialmente disponible DAKO HercepTest® (DAKO, Carpintería, Calif.). Este último ensayo utiliza un intervalo específico de tinción celular 0 a 3+ (siendo 0 expresión normal e indicando 3+ la expresión positiva más fuerte) para identificar los cánceres que presentan sobreexpresión de la proteína HER2 (ver la información de prescripción completa de Herceptin® (trastuzumab); septiembre de 1998; Genentech Inc., San Francisco, Calif.). De esta manera, los pacientes que presentan un cáncer caracterizado por la sobreexpresión de la proteína HER2 en el intervalo de 1+, 2+ o 3+, preferentemente 2+ o 3+, más preferentemente 3+, se beneficiarían de los métodos de terapia de la presente invención.
 55 60 65

La expresión “cáncer positivo para HER2” se refiere a una enfermedad cancerosa, tal como cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer de glándulas salivares, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer peritoneal, cáncer de próstata o cáncer colorrectal, que se caracteriza por la sobreexpresión de la proteína HER2.

5 El cáncer positivo para HER2 puede ser, por ejemplo, cáncer pulmonar, cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), cáncer pulmonar de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, 10 cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, leucemia crónica o aguda, linfomas linfocíticos, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario, incluyendo versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados. La condición o lesión precancerosa incluye, por ejemplo, el grupo consiste de leucoplaquia oral, queratosis actínica (queratosis solar), pólipos precancerosos del colon o recto, displasia epitelial gástrica, displasia adenomatosa, síndrome del cáncer de colon no asociado a poliposis hereditario (SCCNP), esófago de Barrett, displasia de vejiga y condiciones cervicales precancerosas. En una realización preferente, el cáncer es un cáncer recurrente de mama positivo para HER2, que se trata preferentemente seguidamente o posteriormente a una monoterapia de primera línea con un anticuerpo anti-HER2, en la que dicho anticuerpo anti-HER2 preferentemente es trastuzumab.

25 La expresión “cáncer de mama” se refiere al crecimiento incontrolado de células de mama anormales. Incluye el carcinoma ductal in situ, el carcinoma ductal invasivo, el carcinoma lobular in situ, el carcinoma lobular invasivo, el carcinoma medular, la enfermedad de Paget del pezón y el cáncer de mama metastásico.

30 La expresión “cáncer recurrente” se refiere al crecimiento incontrolado de células anormales en pacientes de tumor que inicialmente han respondido a la terapia anterior, pero en los que no se mantuvo la respuesta terapéutica. La expresión “cáncer recurrente positivo para HER2” se refiere al crecimiento incontrolado de células anormales caracterizado por la sobreexpresión de la proteína HER2 en pacientes tumorales que inicialmente respondieron a la terapia anterior con un anticuerpo anti-HER2, preferentemente trastuzumab, pero en los que no se mantuvo la respuesta terapéutica durante el tratamiento con dicho anticuerpo anti-HER2. Los pacientes tumorales que respondieron inicialmente a la terapia anterior con un anticuerpo anti-HER2, preferentemente trastuzumab, pero en los que no se mantuvo la respuesta terapéutica, se denominan “recurrentes”.

40 La respuesta terapéutica (RT) se establece basándose en el criterio médico de un profesional de la salud determinado a partir de los resultados de datos clínicos y de laboratorio que es generalmente conocido de la técnica que se utilizan para evaluar el tratamiento del paciente. Dichos datos pueden obtenerse, a título de ejemplo, a partir del examen clínico, técnicas citológicas e histológicas, endoscopia y laparoscopia, ultrasonidos, escaneos de TC y de RMN, radiografías torácicas y mamografías, y midiendo la concentración de marcadores tumorales, tales como ACE, Cyfra, CA15-3, interleuquina-8 y HER2 soluble. Preferentemente pueden utilizarse los criterios RECIST para determinar la respuesta tumoral (RT) (Therasse *et al.*, J. Nat. Cancer Institute. 92:205-216, 2000).

50 Según dichos criterios RECIST, la respuesta de los tumores sólidos (Therasse *et al.*, J. Nat. Cancer Institute 92:205-216, 2000) se clasifica según la progresión o regresión de volumen de los tumores (por ejemplo medida mediante TC) en cuatro niveles: respuesta completa (RC) o respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) y enfermedad progresiva (EP) (ver la Tabla 1). Además, la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORT por sus siglas en inglés, European Organization for Research and Treatment of Cancer) ha propuesto una clasificación en cuatro niveles según el metabolismo de los tumores medido mediante tomografía de emisión de positrones de 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxiglucosa (TEP-FDG) (Young H. *et al.*, Eur. J. Canc. 35:1773-1782, 1999, y Kelloff G.J. *et al.*, Clin. Canc. Res. 11:2785-2808, 2005): respuesta metabólica completa (RMC) o respuesta metabólica parcial (RMP), enfermedad metabólica estable (EME) y enfermedad metabólica progresiva (EMP) (ver la Tabla 2).

Tabla 1: criterios de TC (acc. a RECIST)

medición de TC: cambios en las sumas de diámetros más largos	RECIST
Desaparición; confirmada a las 4 semanas (tras el inicio del tratamiento)	RC
reducción de 30%; confirmada a las 4 semanas	RP
No se cumplen los criterios de RP ni de EP	EE
20% de incremento, ni RC ni RP ni EE documentadas antes del incremento de la enfermedad	EP

Tabla 2: Criterios de TEP-FDG propuestos (acc. a EORTC, ver Young H. *et al.*, Eur. J. Canc. 35:1773-1782, 1999)

medición de TEP	Criterios de TEP-FDG propuestos
Resolución completa de incorporación tumoral de 2 ^[18F] -fluoro-2-desoxiglucosa (FDG)	RMC
Reducción de un mínimo de 15% a 25% del valor de incorporación estandarizado (VIE) tras un ciclo de tratamiento y de >25% tras más de un ciclo de tratamiento	RMP
Incremento del valor de incorporación estandarizado (VIE) <25% o reducción del VIE <15%. Sin incremento visible del grado de incorporación tumoral de FDG (>20% de la dimensión más larga)	EME
Incremento de VIE>25%. Incremento visible de incorporación tumoral de FDG (>20% de la dimensión más larga. Aparición de nueva incorporación de FDG en lesiones metastásicas	EMP

De esta manera, la “Respuesta (RE)” y la “no respuesta (NR)” según la presente invención se establecen más preferentemente basándose en datos adquiridos mediante la combinación de tomografía computerizada (TC) y tomografía de emisión de positrones de 2-[18F]-fluoro-2-desoxiglucosa (TEP-FDG) (Kelloff G.J. *et al.*, Clin. Canc. Res. 11:2785-2808, 2005, y Young H. *et al.*, Eur. J. Canc. 35:1773-82, 1999) utilizando los criterios tanto RECIST como TEP-FDG indicados anteriormente. De acuerdo con lo anterior, la respuesta (RE) y no respuesta (NR) según la presente invención se determinan de la manera siguiente:

5 Respuesta (RE): se establece la RC o la RP mediante los criterios TC-RECIST (Tabla 1) y simultáneamente la RMC o RMP se establece mediante TEP-FDG (Tabla 2). De esta manera, la Respuesta (RE) se refiere a una de los cuatro casos siguientes para la medición combinada de TC y TEP: RC y RMC, RP y RMP, RC y RMP, y RP y RMC.

10 No respuesta (NR): se establece EE o EP mediante los criterios TC-RECIST (Tabla 1) y simultáneamente la EME o EMP se establece mediante TEP-FDG (Tabla 2). De esta manera, los cuatro casos siguientes de medición combinada de TC y TEP significan no respuesta (NR): EE y EME, EE y EMP, EP y EMP, y EP y EMP.

15 Habitualmente la respuesta se determina aproximadamente a las 3-8 semanas, preferentemente a las aproximadamente 6 semanas, tras el inicio del tratamiento. Esta determinación de la respuesta habitualmente se repite a intervalos de 4 a 8 semanas, preferentemente de 6 a 8 semanas. Al identificar una respuesta significativa (RE) en la primera determinación, puede determinarse una recaída (ello implica una no respuesta (NR) después de la primera determinación) como más temprano en la segunda determinación de respuesta. El tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF se inicia como más temprano después de la determinación de una recaída del cáncer positivo para HER2. Preferentemente el tratamiento con el anticuerpo anti-VEGF de un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente se inicia como más temprano tras 12 semanas, más preferentemente tras 15 semanas, y todavía más preferentemente tras 18 semanas, desde el punto temporal en el que se inicio el tratamiento con dicho anticuerpo anti-HER2. El cáncer que debe tratarse es un cáncer positivo para HER2 recurrente, preferentemente cáncer de mama positivo para HER2 recurrente.

20 La expresión “paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente” se refiere a un paciente en el que se ha establecido respuesta (RE) tras la primera determinación de respuesta, y que en la segunda o posterior determinación de respuesta se establece la no respuesta (NR).

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “paciente” preferentemente se refiere a un ser humano en necesidad de tratamiento para tratar el cáncer, o una condición o lesión precancerosa. Sin embargo, el término “paciente” también puede referirse a animales no humanos, preferentemente mamíferos, tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros, que requieren tratamiento.

30 El término “grupo” se refiere a un grupo de pacientes, así como un subgrupo de pacientes.

35 La invención comprende la utilización de un anticuerpo anti-VEGF para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o reducción de la metástasis en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente, durante el tratamiento con un anticuerpo anti-HER2.

40 De esta manera, dicho medicamento se administra durante el tratamiento con dicho anticuerpo anti-HER2.

45 En una realización preferente, la invención comprende la utilización de un anticuerpo anti-VEGF para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o reducción de la metástasis en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente, tras una monoterapia de primera línea con un anticuerpo anti-HER2.

50 De esta manera, preferentemente dicho medicamento se administra tras una monoterapia de primera línea con dicho anticuerpo anti-HER2.

Preferentemente dicho anticuerpo anti-VEGF se une al mismo epítipo que el bevacizumab.

Preferentemente dicho anticuerpo anti-VEGF es el bevacizumab.

5 Preferentemente dicho anticuerpo anti-HER2 es el trastuzumab.

10 La expresión “terapia de primera línea” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al primer tipo de terapia farmacológica administrada para el tratamiento del cáncer o metástasis. Lo anterior puede ser una quimioterapia adyuvante o neoadyuvante o inmunoterapia ofrecida inicialmente tras el diagnóstico y/o cirugía. La expresión “quimioterapia o inmunoterapia adyuvante” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tratamiento posterior a la cirugía destinado a prevenir la recaída del cáncer; la expresión “quimioterapia o inmunoterapia neoadyuvante” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tratamiento administrado antes de la cirugía destinado a reducir el tamaño tumoral. El término “quimioterapia” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a quimioterapia del cáncer que es la utilización de sustancias químicas o bioquímicas, como fármacos citotóxicos tales como el 5-fluorouracilo, o terapias dirigidas con anticuerpos monoclonales tales como el trastuzumab, o con inhibidores de quinasa tales como erlotinib, para tratar el cáncer.

20 La expresión “monoterapia de primera línea” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la terapia de primera línea tal como se ha definido anteriormente con una única sustancia química o bioquímica (en contraste con la expresión “terapia de combinación de primera línea”, que se refiere a una terapia de primera línea con dos o más sustancias químicas o bioquímicas).

25 En una realización preferente, la invención comprende la coadministración de dicho anticuerpo anti-VEGF y dicho anticuerpo anti-HER2 en el paciente.

La expresión “método para preparar un medicamento” se refiere a la preparación de un medicamento para la utilización en la indicación especificada en la presente memoria y en particular para la utilización en el tratamiento de tumores, metástasis tumorales o cáncer en general.

30 El término “tratar” tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir, parcial o completamente, el crecimiento de tumores, metástasis tumorales u otras células causantes de cáncer o neoplásicas en un paciente. El término “tratamiento” tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, se refiere al acto de tratar.

35 La expresión “un método de tratamiento” o su equivalente, al aplicarla a, por ejemplo, cáncer, se refiere a un procedimiento o curso de acción que se ha diseñado para reducir o eliminar el número de células de cáncer en un paciente, o para aliviar los síntomas de un cáncer. Un “método de tratamiento” de cáncer o de otro trastorno proliferativo no se refiere necesariamente a que las células de cáncer u otro trastorno serán, de hecho, eliminadas, a que el número de células o el trastorno, de hecho, se reducirán, o a que los síntomas de un cáncer o de otro trastorno, de hecho, se aliviarán. Con frecuencia, se lleva a cabo un método de tratamiento del cáncer incluso que presenta una baja probabilidad de éxito, pero que, dada la historia médica y la esperanza de supervivencia estimada de un paciente, se considera que proporciona un curso de acción globalmente beneficioso.

45 Resulta evidente que los anticuerpos se administran en el paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz, que es la cantidad del compuesto de la invención o combinación que inducirá la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que busca el investigador, veterinario, médico u otro responsable clínico.

50 La cantidad de administración de anticuerpo anti-VEGF o de coadministración de anticuerpo anti-VEGF y anti-HER2 y la planificación de la administración dependerán del tipo (especie, género, edad, peso, etc.) y condición del paciente bajo tratamiento y de la gravedad de la enfermedad o condición bajo tratamiento. Se utilizan dosis habitualmente típicas de anticuerpo anti-VEGF y anti-HER2 como el bevacizumab y el trastuzumab. Por ejemplo, las dosis para la administración de los anticuerpos según la invención pueden ser de entre aproximadamente 1 mg/kg y 50 mg/kg (por ejemplo de entre 0,1 y 20 mg/kg) de anticuerpo en una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg. En un aspecto preferente, los anticuerpos se administran cada dos a tres semanas, a una dosis comprendida entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg. Una dosis preferente de trastuzumab es una dosis de carga de 4 mg/kg administrados como infusión continua y posteriormente 3 infusiones semanales de entre 2 mg/kg y 6 mg/kg, preferentemente de 2 mg/kg, administrados en forma de infusión continua hasta detectar la progresión de la enfermedad. Una dosis preferente para bevacizumab es de entre 5 mg/kg y 15 mg/kg, preferentemente de entre 5 mg/kg y 10 mg/kg, y más preferentemente 5 mg/kg, una vez cada 14 días en forma de una infusión IV.

65 La expresión “durante el tratamiento con un anticuerpo anti-HER2” se refiere a la “coadministración” o “coadministrar” el anticuerpo anti-VEGF que se administra adicionalmente al anticuerpo anti-HER2. La “coadministración” se refiere a que el anticuerpo anti-VEGF se administra adicionalmente al anticuerpo anti-HER2 simultánea o secuencialmente. La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, en la que

preferentemente se deja un periodo de tiempo con ambos (o todos) agentes activos ejerciendo simultáneamente sus actividades biológicas. En el caso de que ambos anticuerpos se administren simultáneamente, la dosis se administra el mismo día en una administración, por ejemplo durante una infusión continua. En el caso de que ambos anticuerpos se administren secuencialmente, la dosis se administra el mismo día en dos administraciones separadas, por ejemplo dos infusiones continuas separadas, o uno de los anticuerpos se administra el día 1 y el segundo anticuerpo se administra entre los días 2 y 7, preferentemente entre los días 2 y 4. Los términos "coadministración" y "coadministrar" con respecto a las dosis de mantenimiento del anticuerpo anti-VEGF y el anticuerpo anti-HER2 se refieren a que las dosis de mantenimiento pueden administrarse simultáneamente, por ejemplo durante una infusión continua, en el caso de que el ciclo de tratamiento resulte apropiado para ambos anticuerpos. Alternativamente, las dosis de mantenimiento se administran secuencialmente, en uno o varios días, por ejemplo la dosis de mantenimiento del anticuerpo anti-HER2 se administra cada 3 semanas y la dosis de mantenimiento del anticuerpo anti-VEGF se administra cada 2 semanas. También pueden utilizarse otros ciclos de tratamiento, habitualmente de 1 a 4 semanas, preferentemente de 2 a 3 semanas, para ambos anticuerpos.

La expresión "tras el tratamiento con un anticuerpo anti-HER2" se refiere a la administración del anticuerpo anti-VEGF que se administra tras interrumpir el tratamiento con el anticuerpo anti-HER2.

El medicamento puede resultar útil para incrementar la duración de la supervivencia de dicho paciente, incrementando la supervivencia libre de progresión de dicho paciente, incrementando la duración de la respuesta, resultando en una mejora estadísticamente significativa y clínicamente provechosa del paciente tratado según mediciones de la duración de supervivencia, supervivencia libre de progresión, tasa de respuesta o duración de la respuesta. El medicamento puede resultar útil para incrementar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

En una realización preferente, el medicamento resulta útil para reducir la metástasis en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente durante el tratamiento con un anticuerpo anti-HER2 mediante la coadministración de dicho anticuerpo anti-VEGF, preferentemente bevacizumab, y dicho anticuerpo anti-HER2, preferentemente trastuzumab, en el paciente.

El término "metástasis" según la invención se refiere a la transmisión de células cancerosas desde el tumor primario a uno o más sitios en otras áreas en un paciente. Son conocidos de la técnica medios para determinar si un cáncer ha metastazado, y entre ellos se incluyen el escaneo óseo, las radiografías torácicas, el escaneo de TAC, el escaneo de RMN y los ensayos de marcadores tumorales.

Las expresiones "medicamento para prevenir la metástasis" o "medicamento para reducir la metástasis" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a la utilización del medicamento como agente profiláctico contra la metástasis en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente, inhibiendo o reduciendo de esta manera una transmisión adicional de las células cancerosas del tumor primario a uno o más sitios de otras zonas en un paciente. Lo anterior implica que la metástasis del tumor o cáncer metastásico primario se previene, se retrasa o se inhibe. Preferentemente, la metástasis del hígado se impide o se reduce, lo que implica que la transmisión metastásica de las células cancerosas del tumor primario al hígado se impide o se reduce.

En el contexto de la presente invención, pueden utilizarse otros agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o anticáncer adicionales, o compuestos que incrementan los efectos de dichos agentes en el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 tras el fracaso de una terapia anterior, preferentemente una monoterapia de primera línea anterior, con un anticuerpo anti-HER2 (es decir, en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente tras el tratamiento con monoterapia de primera línea de trastuzumab). Preferentemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 se utiliza sin dichos agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o anticáncer adicionales, o compuestos que incrementan los efectos de dichos agentes.

Entre dichos agentes se incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes con una acción alquilante, tales como ciclofosfamida (CTX, por ejemplo cytoxan[®]), clorambucilo (CHL, por ejemplo leukeran[®]), cisplatino (CisP, por ejemplo platinol[®]), busulfán (por ejemplo myleran[®]), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C, y similares; antimetabolitos, tales como metotrexato (MTX), etopósido (VP16, por ejemplo vepesid[®]), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo Xeloda[®]), dacarbazina (DTIC), y similares; antibióticos, tales como actinomicina D, doxorubicina (DXR, por ejemplo adriamycin[®]), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides, tales como alcaloides vinca, tales como vincristina (VCR), vinblastina, y similares; y otros agentes antitumorales, tales como paclitaxel (por ejemplo taxol[®]) y derivados del paclitaxel, los agentes citostáticos, glucocorticoides, tales como dexametasona (DEX, por ejemplo decadron[®]) y corticoesteroides, tales como prednisona, inhibidores de enzimas nucleósidos, tales como hidroxiaurea, enzimas que disminuyen los aminoácidos, tales como asparaginasa, leucovorina y otros derivados del ácido fólico, y similares; diversos agentes antitumorales. También pueden utilizarse los agentes siguientes como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo etiol[®]), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo doxil[®]), gemcitabina (por ejemplo gemzar[®]), daunorubicina lipo (por ejemplo daunoxome[®]), procarbina, mitomicina, docetaxel (por ejemplo taxotere[®]), aldesleuquina, carboplatino, oxaliplatino,

5 cladribina, camptotecina, CPT 11 (irinotecan), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecán, leuprolido, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza uracilo, vinorelbina y clorambucilo. Preferentemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 o el tratamiento de anticuerpo anti-VEGF se utiliza sin dichos agentes adicionales.

10 En el contexto de la presente invención, un agente antihormonal puede utilizarse en el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 tras el fracaso de una terapia anterior, preferentemente una monoterapia de primera línea anterior, con un anticuerpo anti-HER2 (es decir, en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente). Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente antihormonal" inhibe la acción hormonal sobre los tumores. Entre los agentes antihormonales se incluyen, por ejemplo: antagonistas de receptores esteroides, antiestrógenos tales como tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazolas, otros inhibidores de aromatasa, 42-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (por ejemplo Fareston®); antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido y goserelina, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriormente indicados; agonistas y/o antagonistas de hormonas glucoproteicas, tales como hormona folículo-estimulante (HFE), hormona estimulante del tiroides (HET) y hormona luteinizante (HL) y HLHL (hormona liberadora de hormona luteinizante); el agonista de HLHL acetato de goserelina, disponible comercialmente como Zoladex® (AstraZeneca); el antagonista de HLHL D-alaninamida N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-alanil-4-cloro-D-fenilalanil-3-(3-piridinil)-D-alanil-L-seril-N6-(3-piridinil-carbonil)-L-lisil-N6-(3-piridinil-carbonil)-D-lisil-L-leucil-N6-(1-metiletil)-L-lisil-L-prolina (por ejemplo Antide®, Ares-Serono); el antagonista de HLHL acetato de ganirelix; los antiandrógenos esteroides acetato de ciproterona (CPA) y acetato de megestrol, disponible comercialmente como Megace® (Bristol-Myers Oncology); el antiandrógeno no esteroideo flutamida (2-metil-N-[4,20-nitro-3-(trifluorometil)fenilpropanamida], disponible comercialmente como Eulexin® (Schering Corp.); el antiandrógeno no esteroideo nilutamida (5,5-dimetil-3-[4-nitro-3-(trifluorometil-4'-nitrofenil)-4,4-dimetil-imidazolidin-diona] y antagonistas de otros receptores no permisivos, tales como antagonistas de RAR (receptor de ácido retinoico), RRX (receptor del retinoide X), RT (receptor de tiroides), RVD (receptor de vitamina D) y similares. Preferentemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 o el tratamiento de anticuerpo anti-VEGF se utiliza sin dichos agentes antihormonales adicionales.

35 La utilización de los agentes citotóxicos y otros agentes anticáncer indicados anteriormente en regímenes quimioterapéuticos, se encuentra generalmente bien caracterizada en las técnicas terapéuticas del cáncer, y su utilización en la presente memoria se encuentra comprendida dentro de las mismas consideraciones de tolerancia al seguimiento y efectividad del mismo, y de control de las vías y dosis de administración, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosis reales de los agentes citotóxicos pueden variar dependiendo de la respuesta de las células en cultivo del paciente determinada mediante la utilización de métodos de cultivo de tejidos. Generalmente, se reduce la dosis en comparación con la cantidad utilizada en ausencia de otros agentes adicionales.

40 Las dosis típicas de un agente citotóxico eficaz pueden encontrarse comprendidas en los intervalos recomendados por el fabricante y en donde se indique, por las respuestas *in vitro* o las respuestas en modelos animales, pueden reducirse hasta en un orden de magnitud. De esta manera, la dosis real dependerá del criterio del médico, de la condición del paciente y de la eficacia del método terapéutico, basada en la sensibilidad *in vitro* de las células malignas en cultivo primario o de la muestra de tejido en histocultivo, o de las respuestas observadas en los modelos animales apropiados.

50 En el contexto de la presente invención, pueden utilizarse agentes antiproliferativos adicionales en el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 tras el fracaso de una terapia anterior, preferentemente una monoterapia de primera línea anterior, con un anticuerpo anti-HER2, incluyendo, por ejemplo: inhibidores del enzima farnesil proteína transferasa e inhibidores del receptor tirosina quinasa RFLDP, incluyendo los compuestos dados a conocer y reivindicados en las patentes US nº 6.080.769, nº 6.194.438, nº 6.258.824, nº 6.586.447, nº 6.071.935, nº 6.495.564, nº 6.150.377, nº 6.596.735 y nº 6.479.513, y la publicación de patente internacional nº WO 01/40217. Preferentemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 o el tratamiento de anticuerpo anti-VEGF se utiliza sin dichos agentes antiproliferativos adicionales.

60 En el contexto de la presente invención, puede utilizarse una cantidad eficaz de radiación ionizante y/o puede utilizarse un radiofarmacéutico además del tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 tras el fracaso de una terapia anterior, preferentemente una monoterapia de primera línea anterior, con un anticuerpo anti-HER2 (es decir, en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente). La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente bajo tratamiento. En el caso de que la fuente sea externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de haz externo (EBRT). En el caso de que la fuente de radiación sea interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT). Los átomos radioactivos para la utilización en el contexto de la presente invención pueden seleccionarse de entre el grupo que incluye, aunque sin limitación, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. En el caso de que el inhibidor de RFCE quinasa según la presente invención sea un anticuerpo, también

resulta posible marcar el anticuerpo con dichos isótopos radioactivos. Preferentemente, el tratamiento de combinación de anticuerpo anti-VEGF más anticuerpo anti-HER2 se utiliza sin dicha radiación ionizante.

La terapia de radiación es un tratamiento estándar para controlar los tumores y/o metástasis tumorales no resecables o inoperables. Se han observado resultados mejorados al combinar la terapia de radiación con la quimioterapia. La terapia de radiación se basa en el principio de que la radiación de dosis elevada administrada en un área diana resultará en la muerte de las células reproductoras en tejidos tanto tumorales como normales. El régimen de dosificación de radiación generalmente se define en términos de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y fraccionamiento, y debe ser cuidadosamente definida por el oncólogo. La cantidad de radiación recibida por un paciente dependerá de diversas consideraciones, aunque las dos más importantes son la localización del tumor en relación a otras estructuras u órganos críticos del cuerpo, y el grado en el que se ha extendido el tumor. Un curso típico de tratamiento para un paciente sometido a terapia de radiación será un programa de tratamiento de 1 a 6 semanas de duración, con una dosis total de entre 10 y 80 Gy administrados en el paciente en una única fracción diaria de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días por semana. En una realización preferente de la presente invención existe sinergia en el caso de que los tumores en pacientes humanos se traten con el tratamiento de combinación de la invención y radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral por medio de los agentes que comprenden la terapia de combinación o individual de la invención se potencia en combinación con radiación, opcionalmente con agentes quimioterapéuticos o anticáncer adicionales. Los parámetros de terapias adyuvantes de radiación se encuentran contenidos en, por ejemplo, la publicación de patente internacional nº WO 99/60023.

Los anticuerpos se administran en el paciente según métodos conocidos, mediante administración intravenosa en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. La administración intravenosa o subcutánea de los anticuerpos resulta preferente.

También se da a conocer un artículo fabricado que comprende un recipiente, una composición dentro del recipiente que comprende un anticuerpo anti-VEGF y un impreso en el paquete con instrucciones para el usuario de la composición sobre la administración de dicho anticuerpo anti-VEGF en el paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente durante o después del tratamiento con un anticuerpo anti-HER2.

La expresión "impresos dentro del paquete" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes a la utilización de dichos productos terapéuticos.

Los recipientes de artículos fabricados pueden incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. El artículo fabricado puede incluir además un diluyente estéril, que preferentemente se almacena en un recipiente adicional separado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y la totalidad de los materiales compatibles con la administración farmacéutica, incluyendo solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en las composiciones de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1 Actividad antitumoral de a) tratamiento combinado de trastuzumab y bevacizumab, y b) tratamiento de bevacizumab solo sobre el crecimiento tumoral tras el fracaso del tratamiento con trastuzumab. Los valores medios de volumen tumoral (mm^3) se representan en el eje y; el número de días tras la inyección de las células tumorales se representa en el eje x. A) Vehículo (*círculos*), B) trastuzumab a una dosis de carga de 30 mg/kg y dosis de mantenimiento de 15 mg/kg una vez a la semana (*cuadrados tras el día 60*), C y D. El tratamiento con trastuzumab solo se mantuvo sólo para el grupo B' con dosis de una vez a la semana de 15 mg/kg (dosis de mantenimiento). C) a partir del día 61, dosis de mantenimiento de trastuzumab de 15 mg/kg una vez a la semana en combinación con una dosis de tratamiento de bevacizumab adicional de 5 mg/kg dos veces a la semana (*triángulos*), y D) a partir del día 61, bevacizumab a una dosis de 5 mg/kg dos veces a la semana, momento en que se interrumpió el tratamiento con trastuzumab (cruces). Puntos temporales con un ratón (*) o más

Figura 2 Efecto de (A) grupo de no tratamiento-vehículo, (B) tratamiento de trastuzumab solo (hasta el día 83), (C) (tratamiento de combinación de trastuzumab y bevacizumab (día 61-día 112) tras el

tratamiento de trastuzumab solo (día 27-día 60), y (D) tratamiento de bevacizumab solo (día 61-día 112) tras el tratamiento de trastuzumab solo (día 27-día 60) sobre la metástasis hepática. Valor medio de secuencia de ADN Alu humana (pg/ml) cuantificada a partir de tejido hepático utilizando PCR en tiempo real y representado en el eje y.

- 5 Procedimientos experimentales
- Introducción
- 10 El presente estudio examinó la actividad antitumoral de a) la combinación de trastuzumab y bevacizumab, y b) el tratamiento con bevacizumab solo, tras el fracaso del tratamiento de trastuzumab solo en el modelo de xenoinjerto de mama humano. Fue un objetivo adicional del estudio examinar los efectos del tratamiento sobre la metástasis.
- Agentes de ensayo
- 15 Se proporcionó trastuzumab en forma de solución madre 25 mg/ml en histidina-HCl, alfa-alfa-trehalosa (60 mM), polysorb al 0,01%, pH 6,0 (Herceptin®). Se proporcionó bevacizumab en forma de solución madre 25 mg/ml en fosfato de Na, alfa-alfa-trehalosa (60 mM), Polysorb al 0,01%, pH 6,0 (Avastin®). Ambas soluciones se diluyeron apropiadamente en PBS para las inyecciones.
- 20 Líneas celulares y condiciones de cultivo
- La línea celular de cáncer de mama humano KPL-4 se estableció a partir de efusión pleural maligna procedente de un paciente de cáncer de mama con una metástasis de piel inflamatoria y sobreexpresa receptores de la familia de ErbB (Kurebayashi *et al.*, Br. J. Cancer 79:707-17, 1999). Se cultivaron rutinariamente células tumorales en medio DMEM (PAA Laboratories, Austria) complementado con suero de feto bovino al 10% (PAA) y L-glutamina 2 mM (Gibco) a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. Se llevó a cabo el pase de cultivo con tripsina/EDTA 1x (PAA) dividiendo dos semanas/semana. Se utilizó el pase de cultivo P6 para el estudio *in vivo*.
- 25
- Animales
- 30 Los ratones SCID beige (C.B.-17); de 10 a 12 semanas de edad; peso corporal: 18 a 20 g (Charles River, Sulzfeld, Alemania) se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad de acuerdo con directrices internacionales (GV-Solas, Felasa, TierschG). Tras la llegada, los animales se alojaron en la parte de cuarentena de las instalaciones animales durante una semana para que se aclimatasen al nuevo ambiente y para su observación. Se llevó a cabo un seguimiento continuo de su salud de manera regular. Se proporcionó alimentación dietética (Alltromin) y agua (acidificada a pH 2,5 a 3) *ad libitum*.
- 35 Estudios *in vivo* de inhibición del crecimiento tumoral
- 40 Se recolectaron células tumorales (tripsina-EDTA) de los matraces de cultivo (Greiner TriFlask) y se transfirieron a 50 ml de medio de cultivo, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Tras una etapa adicional de lavado con PBS y filtración (filtro para cultivo celular; Falcon 100 µm), se ajustó el título celular final a 0,75x10⁸/ml. La suspensión de células tumorales se mezcló cuidadosamente con una pipeta de transferencia para evitar la agregación de las células. Se llevó a cabo la anestesia utilizando una unidad de inhalación de Stephens para animales pequeños con cámara de preincubación (plexiglás), mascarilla nasal individual para ratones (silicona) e isoflurano (Farmacia-Upjohn, Alemania) en un sistema de circulación cerrado. Dos días antes de la inyección se afeitó el pelaje de los animales. Para la inyección en las almohadillas de grasa mamaria (i.a.g.m.), las células se inyectaron ortotópicamente a un volumen de 20 µl en la penúltima almohadilla de grasa mamaria inguinal derecha de cada ratón anestesiado. Para la implantación ortotópica, se inyectó la suspensión celular a través de la piel bajo el pezón. La inyección de células tumorales corresponde al día 1 del experimento.
- 45
- 50 Seguimiento
- 55 Los animales se controlaron diariamente para la detección de síntomas clínicos de efectos adversos. Para el seguimiento durante la totalidad del experimento, se documentó el peso corporal de los animales dos veces a la semana y se midió el volumen tumoral con un calibrador dos veces a la semana. Se calculó el volumen del tumor primario siguiendo el protocolo de la NCI (VT=1/2ab², en la que a y b son los diámetros largo y corto del tamaño tumoral, en mm; Teicher B., Anticancer drug development guide, Humana Press, 5:92, 1997. Los valores calculados se documentaron como medias y desviaciones estándar.
- 60 Tratamiento de los animales
- 65 Se aleatorizaron los ratones portadores de tumor tras alcanzar el volumen tumoral aproximadamente 100 mm³ (n=10 en cada grupo). Se emparejó estrechamente cada grupo antes del tratamiento, que se inició 27 días después de la inyección de las células tumorales. Grupo A: el grupo de vehículo recibió 10 ml/kg de tampón PBS por vía

intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana. Grupo B: se administró trastuzumab i.p. a una dosis de carga de 30 mg/kg, seguido de dosis de una vez a la semana de 15 mg/kg (dosis de mantenimiento). El día 60 los animales del grupo B se dividieron en tres grupos adicionales, B', C y D. El tratamiento con trastuzumab solo se mantuvo sólo para el grupo B', con dosis de una vez a la semana de 15 mg/kg (dosis de mantenimiento). Grupo C: el día 61, el tratamiento para el grupo C se cambió a un tratamiento de combinación de trastuzumab (15 mg/kg una vez a la semana i.p.) y bevacizumab (5 mg/kg dos veces a la semana i.p.). Grupo D: el día 61, el tratamiento para el grupo D se cambió a una monoterapia de bevacizumab (5 mg/kg dos veces a la semana i.p.), mientras que se interrumpió el tratamiento con trastuzumab.

10 Evaluación de la metástasis

Se determinó la extensión de la células tumorales en el pulmón de los animales sacrificados. Se midió la metástasis según Schneider T. *et al.*, Clin. Exp. Metas. 19:571-582, 2002. Brevemente, se recolectó tejido pulmonar y se cuantificaron las secuencias de Alu humanas mediante PCR en tiempo real. Los niveles de ADN humano más altas, cuantificadas mediante PCR en tiempo real, corresponden a niveles más altos de metástasis.

Resultados

El efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor primario se muestra en la figura 1 y en la Tabla 1. Los tumores en el grupo de vehículo (grupo A) crecieron rápidamente y se sacrificaron los ratones 73 días después de la inyección de células tumorales debido a la ulceración de los tumores y el desarrollo de los síntomas clínicos. El tratamiento con trastuzumab (grupo B) suprimió el crecimiento tumoral significativamente; sin embargo, los tumores empezaron a crecer nuevamente aproximadamente el día 50. El cambio a tratamiento de combinación de trastuzumab y bevacizumab (grupo C), así como el cambio a monoterapia de bevacizumab (grupo D) iniciado el día 61, resultaron ambos en la inhibición completa del crecimiento tumoral durante la duración del experimento (día 112) y el tratamiento resultó bien tolerado.

Tabla 1:

Actividad antitumoral de a) tratamiento combinado de trastuzumab y bevacizumab, y b) tratamiento de bevacizumab solo sobre el crecimiento tumoral tras el fracaso del tratamiento con trastuzumab (datos para la figura 1). Se proporciona el volumen tumoral medio en mm ³ y la desviación estándar (DE).								
Día	Vehículo (A)	DE	Trastuzumab (B +B')	DE	Cambio de trastuzumab a trastuzumab + bevacizumab (C)	DE	cambio de trastuzumab a monoterapia de bevacizumab (D)	DE
27	85	27	81	29				
29	115	42	106	36				
34	136	66	100	49				
37	193	108	97	70				
41	235	163	133	100				
44	335	220	139	128				
48	406	309	172	181				
51	591	463	201	203				
55	690	479	263	286				
58	565	333	315	383				
60	729	402	393	426				
63	911	391	493	531	407	263	427	365
65	898	313	585	582	350	210	306	220
70	1213	440	798	776	190	45	180	142
73	1015	330	961	841	149	44	154	112
77			861	418	146	45	129	78
79			896	434	159	92	127	84
83			1034	485	158	148	97	80
87					193	228	95	57
91					159	166	100	82
94					225	292	120	106
98					242	340	112	95
101					154	160	120	108
105					119	109	92	85
108					175	157	104	105
112					122	68	110	103

30 El efecto de tratamiento sobre la metástasis hepática se muestra en la figura 2 y la Tabla 2. La combinación de trastuzumab y bevacizumab tras el fracaso del tratamiento de trastuzumab resultó en una fuerte reducción de la

5 metástasis. Los niveles de secuencias de Alu humana (correlacionada con la invasión de células tumorales en tejido secundario) eran significativamente inferiores en animales tratados con una terapia de combinación durante 31 días desde el día 61 en comparación con animales tratados con vehículo que se sacrificaron el día 73. Además, la metástasis resultó suprimida en animales tratados con monoterapia de trastuzumab o bevacizumab sacrificados el día 83 o 112, respectivamente. Este efecto inesperado sobre la metástasis contrasta con el efecto observado con fármacos citotóxicos (Geldof *et al.*, *Anticancer Res.* 8:1335-1340, 1988; Murphy J., *Clin. Oncol.* 11:199-201, 1993; y De Larco *et al.*, *Cancer Res.* 61 (2001) 2857-2861).

Tabla 2:

Efecto del tratamiento sobre las metástasis hepáticas. Se cuantificó el ADN de Alu mediante PCR en tiempo real y se informa para cada animal.				
	Vehículo (A) (día 73)	Trastuzumab (B +B') (día 83)	Bevacizumab (D) (día 112)	Trastuzumab + Bevacizumab (C) (día 112)
ADN humano [pg/ml]	41,750	21,000	12,250	7,155
	51,400	10,550	7,405	6,785
	54,500	26,600	45,600	15,500
	19,300	12,250	29,200	8,040
	6,545	37,900	7,640	8,305
	48,550	25,050	22,900	
			7,740	
Media	37,008	22,225	18,962	9,157

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un anticuerpo anti-VEGF para la preparación de un medicamento para impedir o reducir la metástasis en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente, en la que el término "recurrente" se refiere al crecimiento incontrolado de células anormales caracterizado por la sobreexpresión de proteína HER2 en pacientes tumorales que inicialmente respondieron a la terapia anterior con un anticuerpo anti-HER2, pero en la que la respuesta terapéutica no se mantuvo durante el tratamiento con dicho anticuerpo anti-HER2, y en la que dicho medicamento está destinado a la administración en el paciente durante el tratamiento con un anticuerpo anti-HER2.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho medicamento está destinado a la administración en el paciente tras una monoterapia de primera línea con un anticuerpo anti-HER2.
3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que dicho anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.
4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que dicho anticuerpo anti-HER2 es trastuzumab.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el cáncer positivo para HER2 es un cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer de glándulas salivares, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer peritoneal, cáncer de próstata o cáncer colorrectal, caracterizada por la sobreexpresión de proteína HER2.
6. Anticuerpo anti-VEGF para la utilización en un método para prevenir o reducir la metástasis en un paciente que sufre de cáncer positivo para HER2 recurrente, en el que el término "recurrente" se refiere al crecimiento incontrolado de células anormales caracterizado por la sobreexpresión de proteína HER2 en pacientes tumorales que inicialmente respondieron a la terapia anterior con un anticuerpo anti-HER2, pero en la que la respuesta terapéutica no se mantuvo durante el tratamiento con dicho anticuerpo anti-HER2, y en la que dicho anticuerpo anti-VEGF está destinado a la administración en el paciente durante el tratamiento con un anticuerpo anti-HER2.
7. Anticuerpo anti-VEGF para la utilización en un método para prevenir o reducir la metástasis en un paciente según la reivindicación 6, para la administración en el paciente tras una monoterapia de primera línea con un anticuerpo anti-HER2.
8. Anticuerpo anti-VEGF para la utilización en un método para prevenir o reducir la metástasis en un paciente según la reivindicación 6 o 7, que es bevacizumab.
9. Anticuerpo anti-VEGF para la utilización en un método para prevenir o reducir la metástasis en un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que dicho anticuerpo anti-HER2 es el trastuzumab.
10. Anticuerpo anti-VEGF para la utilización en un método para impedir o reducir la metástasis en un paciente según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado por que el cáncer positivo para HER2 es un cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer de glándulas salivares, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer peritoneal, cáncer de próstata o cáncer colorrectal, caracterizado por la sobreexpresión de proteína HER2.

Fig. 1

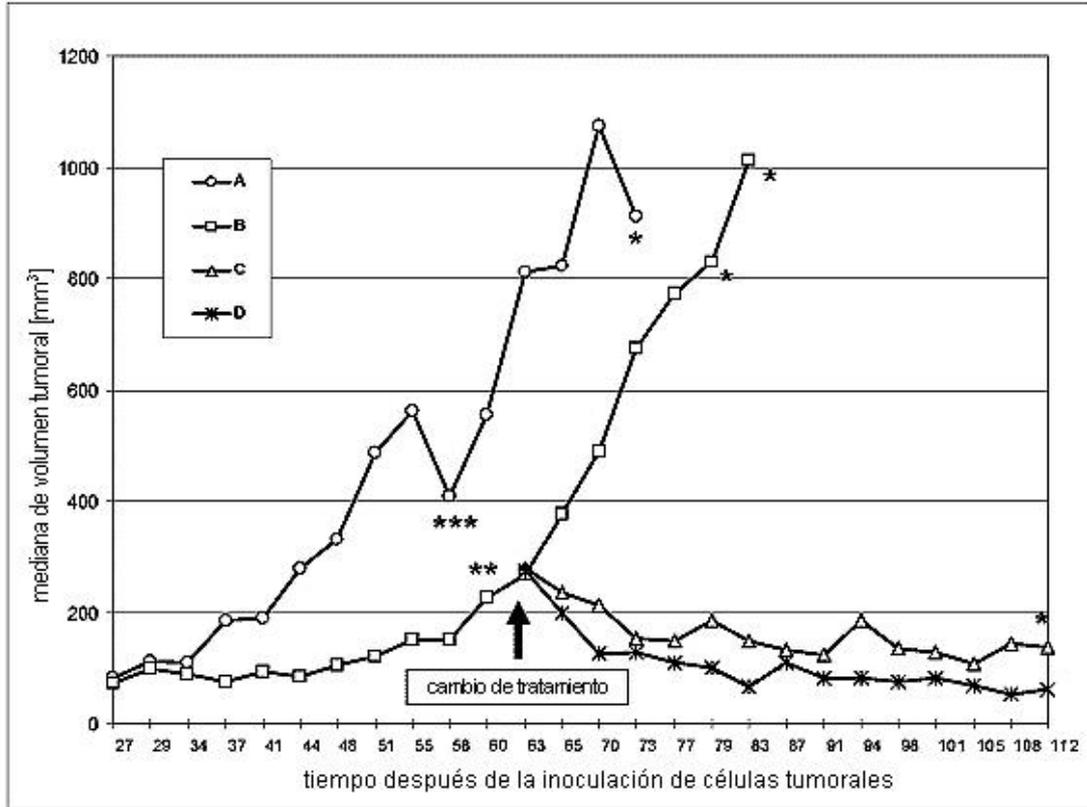


Fig. 2

