

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 656**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61K 38/43** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007 E 07869456 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2101807**

54 Título: **Antagonistas específicos del VEGF para terapia adyuvante y neoadyuvante, y el tratamiento de tumores en fase temprana**

30 Prioridad:

**19.12.2006 US 870741 P**  
**19.12.2006 US 870745 P**  
**27.12.2006 US 877267 P**  
**22.03.2007 US 919638 P**  
**05.07.2007 US 958384 P**  
**20.11.2007 US 989397 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.09.2016**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**FERRARA, NAPOLEONE;**  
**KORSISAARI, NINA y**  
**MASS, ROBERT D.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 582 656 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

Antagonistas específicos del VEGF para terapia adyuvante y neoadyuvante, y el tratamiento de tumores en fase temprana

5

**Antecedentes**

El cáncer es una de las amenazas más letales para la salud humana. Solo en EE.UU., el cáncer afecta a casi 1,3 millones de nuevos pacientes al año, y es la segunda causa de mortalidad detrás de las enfermedades cardiovasculares, lo que representa aproximadamente 1 de cada 4 muertes. Los tumores sólidos son responsables de la mayor parte de esas muertes. Aunque se han producido avances significativos en el tratamiento médico de ciertos tipos de cáncer, la tasa global de supervivencia a los 5 años para todos los tipos de cáncer ha mejorado solo aproximadamente un 10 % en los últimos 20 años. Los cánceres o tumores malignos, se vuelven metastásicos y crecen rápidamente de una manera incontrolada, dificultando sumamente la detección y el tratamiento a tiempo.

15

Los métodos actuales de tratamiento del cáncer son relativamente no selectivos y, en general, se dirigen al tumor una vez que el cáncer ha progresado hasta un estado más maligno. La cirugía elimina el tejido enfermo; la radioterapia reduce los tumores sólidos; y la quimioterapia mata las células que se dividen con rapidez. La quimioterapia, en particular, produce numerosos efectos secundarios, en algunos casos, tan graves como para limitar la dosis que se puede administrar y, por lo tanto, para impedir el uso de fármacos potencialmente eficaces. Por otra parte, los cánceres suelen desarrollar resistencia a los fármacos quimioterapéuticos. El tratamiento de tumores benignos o en fase temprana sería deseable para prevenir la progresión a un estado maligno o metastásico, reduciendo así la morbilidad y la mortalidad asociadas con el cáncer.

20

Para la mayoría de los pacientes recién diagnosticados con cáncer operable, el tratamiento convencional es la cirugía definitiva, seguida de la quimioterapia. Dicho tratamiento tiene como objetivo la eliminación de la enfermedad primaria y metastásica en la mayor medida posible con el fin de prevenir la reaparición y mejorar la supervivencia. De hecho, la mayoría de estos pacientes no tiene ninguna evidencia macroscópica de tumor residual tras la cirugía. Sin embargo, muchos de ellos desarrollan más tarde reaparición y pueden llegar a morir de sus enfermedades. Esto se debe a que un pequeño número de células tumorales viables se vuelven metastásicas antes de la cirugía, escapando de la cirugía y no siendo detectadas después de la cirugía debido a la limitación de las técnicas de detección actuales.

25

30

Por lo tanto, los tratamientos adyuvantes postoperatorios cobran importancia como armas auxiliares a la cirugía para eliminar estas células de cáncer micrometastásicas residuales antes de su repoblación y de que sean refractarias. Durante las últimas décadas, los avances en la terapia adyuvante han sido, en general, graduales, centrándose en el uso de diversos agentes quimioterapéuticos. Muchos regímenes quimioterapéuticos han demostrado beneficios clínicos como adyuvantes en el tratamiento de pacientes con indicaciones de cáncer primario en fase temprana, tales como los cánceres de pulmón, de mama y colorrectal. Strauss *et al.* *J Clin Oncol* 22:7019 (2004); International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaboration Group, *N Engl J Med* 350:351-60 (2004). Moertel *et al.* *Ann Intern Med* 122:321-6 (1995); IMPACT *Lancet* 345:939-44 (1995); Citron *et al.* *J Clin Oncol* 21:1431-9 (2003).

35

40

A pesar de los beneficios establecidos de la terapia adyuvante a base de quimioterapia, una limitación principal asociada con la quimioterapia de cualquier tipo es la de las toxicidades significativas. En general, los fármacos quimioterapéuticos no están dirigidos al sitio del tumor, y son incapaces de diferenciar entre células normales y tumorales. El sujeto de la toxicidad es especialmente difícil en el contexto adyuvante debido al largo tratamiento y a su impacto duradero en la calidad de vida de los pacientes. Por otra parte, los beneficios de la quimioterapia adyuvante en pacientes con menor riesgo de reaparición siguen sin estar claros, por lo que es cuestionable si merece la pena para ellos sufrir los efectos secundarios de la quimioterapia.

45

50

La terapia neoadyuvante, un tratamiento adyuvante administrado antes de la cirugía definitiva principal, ha emergido como otra parte importante de la terapia del cáncer. Hay varias ventajas en la administración de tratamiento neoadyuvante antes de la cirugía definitiva. En primer lugar, puede ayudar a mejorar el estado funcional del paciente antes de la cirugía, debido a la reducción del volumen del tumor, ascitis y efusión pleural. En segundo lugar, la reducción del volumen del tumor puede permitir una cirugía menos extensa, preservando así el órgano del paciente y la función del mismo. Esto es particularmente valioso para, por ejemplo, los pacientes con cáncer de mama. Además, la reducción del volumen del tumor puede permitir la cirugía de tumores que antes no se podían operar. Por último, la terapia neoadyuvante puede mejorar la posibilidad de eliminar el tumor por completo mediante cirugía, mejorando así la supervivencia. Durante la última década, ha habido muchos ensayos clínicos de terapia neoadyuvante usando diversos agentes quimioterapéuticos y/o radiación para tratar a pacientes con cánceres tales como cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de recto, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cuello de útero, cáncer de esófago y gástrico, y cáncer de próstata. Para una revisión, véase Tanvetyanon *et al.*, *Southern Med. J.* 98:338-344 (2005).

55

60

Como se ha explicado anteriormente, una de las principales limitaciones asociadas a la quimioterapia de cualquier tipo es la de las toxicidades significativas. Muchos regímenes quimioterapéuticos neoadyuvantes son incómodos, lo

65

que requiere tratamientos frecuentes durante un largo período de tiempo. Por otra parte, los beneficios, especialmente los beneficios para la supervivencia, de la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con menor riesgo de reaparición siguen sin estar claros, por lo que es cuestionable si merece la pena esperar en lugar de someterse a una cirugía de inmediato.

5 La angiogénesis es un importante acontecimiento celular en el que las células endoteliales vasculares proliferan, se reducen y se reorganizan para formar nuevos vasos a partir de la red vascular preexistente. Hay pruebas convincentes de que el desarrollo de un suministro vascular es esencial para los procesos proliferativos normales y patológicos. La entrega de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación de los productos catabólicos, representan etapas limitantes de la velocidad en la mayoría de los procesos de crecimiento que se producen en los organismos multicelulares.

15 Aunque se considera que la inducción de nuevos vasos sanguíneos es el modo predominante de angiogénesis tumoral, datos recientes han indicado que algunos tumores pueden crecer optando junto con los vasos sanguíneos existentes del huésped. La vasculatura cooptada luego retrocede, lo que conduce a la regresión del tumor que finalmente es revertido por la angiogénesis inducida por hipoxia en el margen del tumor.

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

25 Además de ser un factor angiogénico, el VEGF, como factor de crecimiento pleiotrópico, presenta múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos tales como la supervivencia y la proliferación de las células endoteliales, la permeabilidad y la vasodilatación de los vasos, la quimiotaxis de los monocitos y la entrada de calcio. Por otra parte, otros estudios han informado de efectos mitógenos del VEGF en unos cuantos tipos de células no endoteliales tales como las células epiteliales pigmentarias de la retina, células del conducto pancreático y células de Schwann.

30 El reconocimiento de VEGF como regulador primario de la angiogénesis en condiciones patológicas ha conducido a numerosos intentos de bloquear las actividades de VEGF en las condiciones que implican la angiogénesis patológica.

35 La expresión de VEGF está regulada positivamente en la mayoría de los tumores malignos, y la sobreexpresión de VEGF se correlaciona con una fase más avanzada o con un peor pronóstico en muchos tumores sólidos. Por lo tanto, las moléculas que inhiben las vías de señalización de VEGF se han usado para el tratamiento de tumores sólidos relativamente avanzados en los que se observa angiogénesis patológica.

40 A pesar de las pruebas que implican el papel de VEGF en el desarrollo de afecciones o enfermedades que implican angiogénesis patológica, incluyendo tumores en fase final, metastásicos o invasivos, se sabe menos sobre el papel de VEGF en los cánceres en fase temprana y benignos, en la reaparición de los tumores tras un período de latencia o en el desarrollo de tumores en sitios secundarios de tumores latentes, tumores malignos o micrometástasis. La invención aborda estas y otras necesidades, como será evidente tras la revisión de la siguiente divulgación.

#### 45 **Sumario de la invención**

50 El uso de antagonistas específicos del VEGF en combinación con la quimioterapia ha demostrado ser beneficioso en pacientes con cáncer colorrectal y cáncer de pulmón no microcítico metastásicos, entre otros, pero se sabe poco sobre el impacto de la terapia con antagonistas específicos del VEGF en tumores benignos o en fase temprana; en la reaparición de tumores tras la latencia, cirugía u otra intervención; en el desarrollo de tumores en sitios secundarios de tumores latentes, tumores malignos o micrometástasis; o en el entorno adyuvante o neoadyuvante. En el presente documento, se proporcionan resultados que demuestran que los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar para el tratamiento de tumores en fase temprana, incluyendo tumores benignos, precancerosos, no metastásicos y operables. Los resultados demuestran además que los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar para la terapia neoadyuvante del cáncer (por ejemplo, cánceres benignos y malignos) o para prevenir y/o reducir la probabilidad de reaparición del cáncer (por ejemplo, cánceres benignos y malignos), incluyendo métodos de terapia adyuvante. Estos resultados constituyen un avance médico significativo para proporcionar un cuidado más eficaz, y menos tóxico, de los pacientes con cáncer, incluyendo los cánceres benignos, en fase temprana y operables (tanto antes como después de la cirugía).

65 Se desvelan métodos de tratamiento de un cáncer benigno, precanceroso o no metastásico en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF. En ciertas realizaciones, la administración del antagonista específico del VEGF evita que el cáncer benigno, precanceroso o no metastásico se convierta en un cáncer invasivo o metastásico. Por ejemplo, el cáncer benigno, precanceroso o no metastásico puede ser un cáncer en fase 0, fase I o fase II, y en ciertas realizaciones, la administración del

- antagonista específico del VEGF evita la progresión del cáncer benigno, precanceroso o no metastásico al/a las siguiente/s fase/s, por ejemplo, a un cáncer en fase I, fase II, fase III o fase IV. En ciertas realizaciones, el antagonista específico del VEGF se administra durante un tiempo y en una cantidad suficientes para tratar el tumor benigno, precanceroso o no metastásico en el sujeto o para prevenir que el tumor benigno, precanceroso o no metastásico se convierta en un cáncer invasivo o metastásico. En ciertas realizaciones, la administración del antagonista específico del VEGF reduce el tamaño tumoral, la carga tumoral o el número de tumores del tumor benigno, precanceroso o no metastásico. El antagonista específico del VEGF también se puede administrar en una cantidad y durante un tiempo para disminuir la densidad vascular en el tumor benigno, precanceroso o no metastásico.
- Como se describe en el presente documento, los métodos se pueden usar para tratar, por ejemplo, un cáncer en fase 0 (por ejemplo, un carcinoma *in situ*), fase I o fase II. Los métodos de terapia neoadyuvante y adyuvante se pueden usar para tratar cualquier tipo de cáncer, por ejemplo, benigno o maligno.
- La invención, como se define en las reivindicaciones, proporciona un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de unión al antígeno del mismo que bloquea la unión de VEGF a más de un receptor de VEGF, para su uso en un método de tratamiento para prevenir la aparición de un cáncer benigno, precanceroso o no metastásico en un sujeto con antecedentes familiares de cáncer, pólipos o un síndrome de cáncer hereditario (por ejemplo, neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN1)). En ciertos aspectos de la invención, el sujeto está en riesgo de desarrollar un tumor gastrointestinal benigno, precanceroso o no metastásico, un tumor desmoide o un adenoma (por ejemplo, un adenoma gastrointestinal, un adenoma hipofisario o un adenoma de páncreas). De acuerdo con la invención, el sujeto nunca ha tenido un cáncer detectable clínicamente.
- En ciertas realizaciones de la invención, la cáncer es un tumor sólido de células epiteliales, incluyendo, pero sin limitación, cáncer gastrointestinal, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado y cánceres de tejidos blandos (por ejemplo, linfomas de linfocitos B tal como LNH y mieloma múltiple, y leucemias tales como leucemia linfocítica crónica). En otra realización, el tumor benigno, precanceroso o no metastásico es un pólipo, adenoma, fibroma, lipoma, gastrinoma, insulinooma, condroma, osteoma, hemangioma, linfangioma, meningioma, leiomioma, rabdomioma, papiloma de células escamosas, neuromas acústicos, neurofibromas, cistoma del conducto biliar, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, tracomias, granulomas, hamartoma, papiloma de células transicionales, adenoma pleiomórfico de la glándula salival, tumor desmoide, quistpapiloma dermoide, cistoadenoma, hiperplasia nodular focal o una hiperplasia nodular regenerativa. En otra realización, la invención es deseable para su uso en el tratamiento de un adenoma. Los ejemplos no limitantes de adenomas incluyen adenoma celular hepático, adenoma renal, adenoma metanéfrico, adenoma bronquial, adenoma alveolar, adenoma adrenal, adenoma hipofisario, adenoma de paratiroides, adenoma pancreático, adenoma de la glándula salival, adenoma hepatocelular, adenoma gastrointestinal, adenoma tubular y adenoma de conducto biliar.
- También se desvela un método de tratamiento de un tumor gastrointestinal en fase 0, fase I o fase II en un sujeto que incluye administrar al sujeto un antagonista específico del VEGF durante un tiempo y en una cantidad suficientes para tratar el tumor gastrointestinal en fase 0, fase I o fase II en el sujeto. El tumor gastrointestinal puede ser cualquier cáncer en fase 0, fase I o fase II del sistema gastrointestinal, incluyendo cáncer anal, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de páncreas y cáncer de intestino delgado. En una realización, el tumor gastrointestinal es un tumor en fase 0 (por ejemplo, un adenoma de alto grado) o un tumor en fase I. En una realización, el sujeto no ha sido sometido a una resección para tratar el tumor gastrointestinal.
- También se desvela un método de tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar un tumor gastrointestinal que incluye la administración al sujeto de un antagonista específico del VEGF durante un tiempo y en una cantidad suficientes para prevenir la aparición o la reaparición del tumor gastrointestinal en el sujeto. El tumor gastrointestinal puede ser cualquier tumor gastrointestinal incluyendo, pero sin limitación, un adenoma, uno o más pólipos, o un cáncer en fase 0, I o II.
- En ciertas realizaciones de los métodos anteriores, el sujeto es un ser humano de aproximadamente 50 años, tiene un síndrome de cáncer hereditario o tiene antecedentes familiares de cáncer de colon o pólipos. Los ejemplos no limitantes de los síndromes de cáncer gastrointestinal hereditarios incluyen poliposis adenomatosa familiar (PAF), síndrome de Gardner, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal sin poliposis hereditario (HNPCC). En ciertas realizaciones, el sujeto puede o no haber sido sometido previamente a una colonoscopia. En una realización, el antagonista específico del VEGF se administra en una cantidad y durante un tiempo para reducir el número de pólipos colorrectales adenomatosos en un sujeto que tiene PAF.
- También se desvela un método de prevención o de reducción de la probabilidad de reaparición de un cáncer en un sujeto que incluye la administración al sujeto de un antagonista específico del VEGF durante un tiempo y en una cantidad suficientes para prevenir o reducir la probabilidad de reaparición del cáncer en el sujeto. También se desvela un método de prevención de la reaparición de un cáncer en un sujeto que tiene un tumor que incluye las

- 5 etapas de extirpar el tumor (por ejemplo, usando cirugía definitiva) y, posteriormente, administrar al sujeto un antagonista específico del VEGF. También se desvelan métodos de prevención del rebrote de un tumor en un sujeto que incluyen las etapas de extirpar el tumor (por ejemplo, usando cirugía definitiva) y, posteriormente, administrar al sujeto un antagonista específico del VEGF. También se desvela un método de prevención de la reaparición del
- 10 cáncer en un sujeto o la reducción de la probabilidad de reaparición del cáncer en un sujeto que opcionalmente incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF antes de la cirugía, realizar la cirugía definitiva y administrar una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF después de la cirugía, en el que la administración del antagonista específico del VEGF después de la cirugía previene la reaparición del cáncer o reduce la probabilidad de reaparición del cáncer. También se desvela un método de prevención de la
- 15 reaparición del cáncer en un sujeto o la reducción de la probabilidad de reaparición del cáncer en un sujeto que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF en ausencia de cualquier agente terapéutico contra el cáncer adicional, en el que la administración previene la reaparición del cáncer en un sujeto o reduce la probabilidad de reaparición del cáncer en un sujeto.
- 20 Para cada uno de los aspectos anteriores, el tumor puede ser cualquier tipo de tumor, incluyendo pero sin limitación, los tumores sólidos y, en particular, los tumores y adenomas que se describe en el presente documento. El sujeto puede tener un tumor latente o micrometástasis que no sean detectables clínicamente. En una realización de este aspecto, el antagonista específico del VEGF se administra durante un tiempo y en una cantidad suficientes para reducir la neovascularización de un tumor latente o micrometástasis. En otra realización, el antagonista específico del VEGF se administra durante un tiempo y en una cantidad suficientes para evitar la aparición de un tumor detectable clínicamente, o metástasis de los mismos, o para aumentar la duración de la supervivencia del sujeto.
- 25 En una realización, el antagonista específico del VEGF es una monoterapia. En otra realización, el sujeto ha sido tratado previamente del tumor, por ejemplo, usando una terapia contra el cáncer. En un ejemplo, la terapia contra el cáncer es cirugía. En otra realización, el sujeto se puede tratar además con una terapia adicional contra el cáncer antes, durante (por ejemplo, simultáneamente) o después de la administración del antagonista específico del VEGF. Los ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, cirugía, terapia de radiación (radioterapia), bioterapia, inmunoterapia, quimioterapia o una combinación de estas terapias.
- 30 En realizaciones en las que el sujeto ha sido sometido a cirugía definitiva, el antagonista específico del VEGF se administra, en general, después de un período de tiempo en el que el sujeto se ha recuperado de la cirugía. Este período de tiempo puede incluir el tiempo necesario para la cicatrización de la herida o la cicatrización de la incisión quirúrgica, el período de tiempo necesario para reducir el riesgo de dehiscencia de la herida o el período de tiempo necesario para que el sujeto recupere un nivel de salud esencialmente similar al o mejor que el nivel de la salud
- 35 previo a la cirugía. El período comprendido entre la finalización de la cirugía definitiva y la primera administración del antagonista específico del VEGF también puede incluir el tiempo necesario para un descanso del fármaco, en el que el sujeto requiere o solicita un período de tiempo entre los regímenes terapéuticos. En general, el período de tiempo entre la finalización de la cirugía definitiva y el inicio de la terapia con el antagonista específico del VEGF puede incluir menos de una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas (28 días), 5 semanas, 6 semanas, 7
- 40 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años, 3 años, o más. En una realización, el período de tiempo entre la cirugía definitiva y la administración del antagonista específico del VEGF es superior a 2 semanas e inferior a 1 año.
- 45 Cada uno de los aspectos anteriores puede incluir además monitorizar al sujeto para determinar la reaparición del cáncer.
- También se desvelan métodos de terapia neoadyuvante previos a la extirpación quirúrgica del cáncer operable en un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, que comprenden administrar al paciente una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, donde el paciente ha sido diagnosticado de un tumor o
- 50 de cáncer. El antagonista específico del VEGF se puede administrar solo o en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.
- También se desvela un método de tratamiento de un sujeto con cáncer operable que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF antes de la cirugía y, posteriormente, realizar la cirugía mediante la que se extirpa el cáncer. En una realización, el método incluye además la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF tras la cirugía para prevenir la reaparición del cáncer.
- 55 También se desvela un método de terapia neoadyuvante que comprende administrar a un sujeto con cáncer operable una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y al menos un agente quimioterapéutico antes de la cirugía definitiva. El método se puede usar para prolongar la supervivencia libre de enfermedad (SLE) o la supervivencia global (SG) en el sujeto. En una realización, la SLE o la SG se evalúan de aproximadamente 2 a 5 años después del inicio del tratamiento.
- 60 También se desvela un método de reducción del tamaño tumoral en un sujeto que tiene un tumor no resecable que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, en el que la administración reduce el tamaño del tumor, permitiendo así la resección completa del tumor. En una realización, el
- 65

método incluye además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF después de la resección completa del tumor.

5 También se desvela un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende las siguientes etapas: a) una primera fase que comprende una pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que cada ciclo comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y al menos un agente quimioterapéutico en un intervalo predeterminado; b) una cirugía definitiva mediante la que se elimina el cáncer; y c) una segunda fase que comprende una pluralidad de ciclos de mantenimiento, en la que cada ciclo comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, sin ningún agente quimioterapéutico en un intervalo predeterminado. En una realización, la primera fase comprende una primera pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que se administran un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y un primer régimen quimioterapéutico, seguidos de una segunda pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que se administran un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y un segundo régimen quimioterapéutico. En una realización, si el cáncer que se va a tratar es cáncer de mama, el primer régimen quimioterapéutico comprende doxorubicina y ciclofosfamida, y el segundo régimen quimioterapéutico comprende paclitaxel.

20 También se desvelan métodos que comprenden administrar a un sujeto con cáncer metastásico o no metastásico, después de la cirugía definitiva, una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab. En una realización, el método incluye además el uso de al menos un agente quimioterapéutico. El método se puede usar para prolongar la SLE o la SG en el sujeto. En una realización, la SLE o la SG se evalúa de aproximadamente 2 a 5 años después del inicio del tratamiento. En una realización, el sujeto está sano durante al menos 1 a 5 años después del tratamiento.

25 En un aspecto, el método comprende las siguientes etapas: a) una primera fase que comprende una pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que cada ciclo comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y al menos un agente quimioterapéutico en un intervalo predeterminado; y b) una segunda fase que comprende una pluralidad de ciclos de mantenimiento, en la que cada ciclo comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, sin ningún agente quimioterapéutico en un intervalo predeterminado, en el que la primera y la segunda fase combinadas duran al menos un año después del tratamiento postoperatorio inicial. En una realización, la primera fase comprende una primera pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que se administran un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y un primer régimen quimioterapéutico, seguido de una segunda pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que se administran un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y un segundo régimen quimioterapéutico. Si el cáncer que se va a tratar es cáncer de mama, por ejemplo, el primer régimen quimioterapéutico comprende doxorubicina y ciclofosfamida, y el segundo régimen quimioterapéutico comprende paclitaxel.

40 De acuerdo con la invención, el anticuerpo anti-VEGF, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo completamente humano o un anticuerpo humanizado. Los ejemplos de anticuerpos útiles en la invención incluyen bevacizumab (AVASTIN®), G6-31, B20-4.1, y fragmentos de los mismos. El anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, también puede ser un anticuerpo que carezca de una porción Fc, un F(ab')<sub>2</sub>, un Fab o una estructura Fv.

45 Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, las dosis preferidas para el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, se describen en el presente documento y pueden variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, pero sin limitación, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. La frecuencia de administración variará en función del tipo y de la gravedad de la enfermedad. Para administraciones repetidas durante varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que el cáncer se trata o se obtiene el efecto terapéutico deseado, medido mediante los métodos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. En un ejemplo, el anticuerpo antagonista específico del VEGF de la invención se administra una vez a la semana, cada dos semanas o cada tres semanas, a una dosis que varía de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, pero sin limitación, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

60 En realizaciones adicionales de cada uno de los aspectos anteriores, el antagonista específico del VEGF se administra de forma local o sistémica (por ejemplo, por vía oral o por vía intravenosa). En una realización, el tratamiento con un antagonista específico del VEGF se prolonga hasta que el paciente ha estado sin cáncer durante un período de tiempo seleccionado del grupo que consiste en 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años y 12 años.

65 Aunque el sujeto se puede tratar en una serie de diferentes formas antes, durante o después de la administración del antagonista específico del VEGF, en una realización de cada uno de los aspectos de la invención, el sujeto se trata sin cirugía o quimioterapia. En otras realizaciones, el tratamiento con el antagonista específico del VEGF es

una monoterapia o una monoterapia para la duración del período de tratamiento con antagonista específico del VEGF, según lo evaluado por el médico clínico o descrito en el presente documento.

En otras realizaciones, el tratamiento con el antagonista específico del VEGF está en combinación con una terapia adicional contra el cáncer, incluyendo, pero sin limitación, la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la terapia de diferenciación, la bioterapia, la terapia inmune, un inhibidor de la angiogénesis y un compuesto antiproliferativo. El tratamiento con el antagonista específico del VEGF también puede incluir cualquier combinación de los anteriores tipos de regímenes terapéuticos. Además, se pueden usar agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos y agentes antiproliferativos en combinación con el antagonista específico del VEGF. En una realización, la terapia contra el cáncer es quimioterapia. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico se selecciona entre, por ejemplo, agentes, de alquilación, antimetabolitos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores relacionados, alcaloides de la vinca, epipodopilotoxinas, antibióticos, L-asparaginasa, inhibidor de la topoisomerasa, interferones, complejos de coordinación de platino, urea sustituida con antracenediona, derivados de metilhidrazina, supresor adrenocortical, adrenocorticosteroides, progestinas, estrógenos, antiestrógenos, andrógenos, antiandrógenos, análogo de la hormona liberadora de gonadotropina, etc. En algunos aspectos, el agente quimioterapéutico y el antagonista específico del VEGF se administran al mismo tiempo.

En las realizaciones que incluyen una terapia adicional contra el cáncer, el sujeto se puede tratar además con la terapia adicional contra el cáncer antes, durante (por ejemplo, simultáneamente) o después de la administración del antagonista específico del VEGF. En una realización, la terapia contra el cáncer es quimioterapia que incluye la administración de irinotecán, fluorouracilo, leucovorina, gemcitabina o una combinación de los mismos. En una realización, el antagonista específico del VEGF, administrado solo o con una terapia contra el cáncer, se puede administrar como terapia de mantenimiento. En un aspecto, la terapia contra el cáncer para el cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de mama puede ser terapia hormonal. En una realización ilustrativa, el antagonista específico del VEGF se administra en combinación con una terapia contra el cáncer que no incluye un anticuerpo anti-HER2, o fragmento o derivado del mismo (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®).

Los tratamientos de la invención son particularmente ventajosos en la prevención de los tumores en fase temprana, previniéndose así la progresión a las fases más avanzadas, lo que da lugar a una reducción de la morbilidad y la mortalidad asociadas con el cáncer avanzado.

Para los tratamientos de la invención, el cáncer puede ser un tumor sólido, por ejemplo, tal como cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de células renales, un glioma (por ejemplo, el astrocitoma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma multiforme), cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma y cáncer de ovario. En una realización, el cáncer es un cáncer gastrointestinal.

En realizaciones adicionales de cada uno de los aspectos anteriores, el antagonista específico del VEGF se administra en una cantidad o durante un tiempo (por ejemplo, para un determinado régimen terapéutico a lo largo del tiempo) para reducir (por ejemplo, un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más) el número de células cancerosas del tumor o del cáncer, incluyendo, pero sin limitación, los cánceres benignos, precancerosos o no metastásicos; para reducir el tamaño del tumor, pólipo o adenoma; para reducir la carga tumoral; para inhibir (es decir, para disminuir en cierta medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; para reducir la secreción hormonal; para reducir el número de pólipos; para reducir la densidad de los vasos en el tumor o cáncer, incluyendo, pero sin limitación, el cáncer benigno, precanceroso o no metastásico; para inhibir la metástasis tumoral; para reducir o inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células tumorales; para reducir o prevenir el crecimiento de un tumor latente; para reducir o prevenir el crecimiento o la proliferación de una micrometástasis; para reducir o prevenir la rebrote de un tumor tras su tratamiento o eliminación; para aumentar o prolongar la SLE o SG de un sujeto susceptible de padecer o diagnosticado de un tumor benigno, precanceroso o no metastásico; y/o para aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En un ejemplo, la supervivencia se mide como la SLE o la SG en el sujeto, en el que la SLE o la SG se evalúan aproximadamente de 2 a 5 años después del inicio del tratamiento. De acuerdo con la invención, el antagonista específico del VEGF se usa para prevenir la aparición de cáncer en el sujeto.

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

### Breve descripción de las figuras

Las FIGURAS 1A-1F son una serie de microfotografías que muestran la expresión de VEGF-A en adenomas  $Apc^{min/+}$  y vellosidades normales. La hibridación *in situ* con sonda de VEGF-A en un adenoma intestinal de intestino delgado (FIGURAS 1A, 1D) y de intestino grueso (FIGURAS 1B, 1E), así como en vellosidades normales (FIGURAS 1C, 1F) de un ratón  $Apc^{min/+}$  de 14 semanas de vida demuestra la expresión de VEGF-A en las células epiteliales (flechas) y del estroma (puntas de flecha). Campo claro; FIGURAS 1A-1C, campo oscuro; FIGURAS 1D-1F.

Las FIGURAS 2A-2F son una serie de gráficas que muestran que la inhibición de VEGF-A disminuye la carga tumoral y prolonga la supervivencia. La FIGURA 2A es una gráfica que muestra la carga tumoral de cada ratón del grupo. La carga tumoral se indica mediante barras desde el mayor valor al mínimo valor de carga tumoral. Las cruces blancas indican las medias de los grupos. \*P < 0,008, \*\*p < 5,3 x 10<sup>-5</sup>. N designa el número de animales. La FIGURA 2B es una serie de gráficas que muestran la distribución de los tumores por diámetro y como el porcentaje del número total de tumores. N designa el número de tumores de un grupo. La FIGURA 2C es una serie de gráficas que muestran la superposición de las frecuencias del tamaño tumoral tras 3 semanas de tratamiento (parte superior) y tras 6 semanas de tratamiento (mitad). El gráfica inferior muestra una superposición de la frecuencia del tamaño tumoral en comparación con el día 0 (parte inferior). Las barras verticales ilustran el tamaño más pequeño o igual del que la frecuencia del tumor es mayor en animales tratados con mAb G6-31; 1 mm en el grupo de tratamiento de 3 semanas y 1,2 mm en el grupo de tratamiento de 6 semanas. La FIGURA 2D es una gráfica que muestra el diámetro medio del tumor representado frente a la ubicación en el intestino. N designa el número de tumores por grupo en el primer, segundo, tercer y cuarto cuarto intestinal, respectivamente. El grupo del Día 0 contenía doce animales, el resto de grupos, diez. S: estómago, C: ciego, R: recto. Las barras representan el ETM. \*P < 1,0 x 10<sup>-10</sup>, \*\*p < 0,002 en comparación con Ab G6-31 3 o 6 semanas. La FIGURA 2E es una gráfica que muestra el diámetro medio del tumor de catorce ratones *Apc<sup>min/+</sup>*; Villin-Cre (columnas negras) y *Apc<sup>min/+</sup>*; VEGF<sup>lox</sup>; Villin-Cre (columnas grises) presentado en orden decreciente. Las barras representan la desviación estándar (DE). La FIGURA 2F es una gráfica que muestra el de Kaplan-Meier de ratones tratados con mAb G6-31 (línea gris) o IgG de control (línea negra). La flecha sin colorear designa la duración de los tratamientos. La mediana de la supervivencia se indica con las flechas de color gris. \*P < 2,4 x 10<sup>-3</sup>. N designa el número de ratones de un grupo.

Las FIGURAS 3A-3L muestran los efectos del tratamiento anti-VEGF-A en la alteración de la morfología del tumor, pero no el índice de proliferación. Las FIGURAS 3A-3B son microfotografías de un segmento yeyunal de intestino delgado teñido con azul de metileno. Las FIGURAS 3C-3D son microfotografías que muestran imágenes de bajo aumento de un corte teñido con H&E de yeyuno. Las FIGURAS 3E-3F son fotomicrografías que muestran imágenes de alta magnificación de un corte de tumor teñido con H&E de yeyuno. Las FIGURAS 3G-3J son fotomicrografías que muestran la tinción inmunohistoquímica con anticuerpo Ki-67 de tejido tumoral y mucosa normal. Contratinción con H&E. La FIGURA 3K es una gráfica que muestra el índice de proliferación expresado como el porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 con respecto al número total de núcleos. Las barras representan el ETM. La FIGURA 3L es un análisis de transferencia Western de lisados de mucosas normales de animales tratados con IgG de control (N1-N4) o mAb G6-31 (N5-N8). Lisados tumorales de animales tratados con IgG de control (T1-T4) o mAb G6-31 (T5-T8).

Las FIGURAS 4A-4C muestran la reducción de la densidad de la superficie de los vasos tumorales tras el tratamiento con mAb G6-31. Las FIGURAS 4A-4B son imágenes confocales de cortes de 80 µm de tinción inmunohistoquímica de tumores de yeyuno. Verde - CD31, células endoteliales vasculares; azul - E-cadherina, células epiteliales; rojo - actina de músculo liso. La FIGURA 4C es una gráfica que muestra la densidad vascular expresada como el porcentaje de superficie positiva para CD31 con respecto a la superficie total del tumor analizado. Las barras representan el ETM; n designa el número de tumores analizados.

Las FIGURAS 5A-5D son una serie de gráficas que muestran que el tratamiento anti-VEGF-A inhibe el crecimiento tumoral hipofisario. La FIGURA 5A es una gráfica que muestra el volumen tumoral medio de los grupos tratados con la IgG de control (línea negra) y mAb G6-31 (línea gris) los días 9, 25, 39, 53 y 67 del tratamiento. Las barras representan el ETM. N designa el número de ratones del grupo. La FIGURA 5B es una gráfica que muestra los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con IgG de control (líneas continuas) o con mAb G6-31 (líneas discontinuas). Se sacrificaron siete ratones antes del punto final del estudio debido a su mala salud (líneas que terminan antes del punto temporal de los 67 días). La FIGURA 5C es una gráfica que muestra la duplicación de la supervivencia sin tumor de los grupos tratados con la IgG de control (línea negra) y con mAb G6-31 (línea gris) evaluados a los 9, 25, 39, 53 y 67 días de iniciarse el tratamiento. La FIGURA 5D es una gráfica que muestra las mediciones del volumen tumoral de los trasplantes subcutáneos de tumor hipofisario tratados con la IgG de control (línea negra) y con mAb G6-31 (línea gris) a los 1, 7, 14, 21, 28 y 35 días de tratamiento. Las barras representan el ETM. N designa el número de ratones del grupo.

La FIGURA 6 es una gráfica que muestra que los adenomas de hipófisis y los adenomas hipofisarios *Men1<sup>+/-</sup>* expresan VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2. Se muestra la expresión relativa de VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 para la hipófisis de tipo silvestre (columna negra), tejido no tumoral de hipófisis de ratones *Men1<sup>+/-</sup>* (gris), adenomas hipofisario de pequeño tamaño sin tratar, tumores hipofisarios tratados con IgG de control (rojo) y con mAb G6-31 (azul) de ratones *Men1<sup>+/-</sup>*. Las barras representan el ETM. Ns; no significativo.

La FIGURA 7 es una serie de imágenes de MRI de tumores hipofisarios representativos de ratones *Men1<sup>+/-</sup>*. Se muestran cortes coronales con adenomas hipofisarios de un ratón tratado con IgG de control y con mAb G6-31 a los 9, 39 y 67 días del tratamiento. Para el día nueve, los bordes de los adenomas hipofisarios se han destacado con asteriscos amarillos. El volumen del tumor tratado con IgG de control fue de 23,2; 55,9 y 142,0 mm<sup>3</sup>, y el del tumor tratado con mAb G6-31 de 18,9; 27,2 y 35,3 mm<sup>3</sup> a los 9, 39 y 67 días de iniciarse el tratamiento, respectivamente.

Las FIGURAS 8A-8H son una serie de imágenes que muestran el examen histológico de tumores hipofisarios y de páncreas de ratones *Men1<sup>+/-</sup>*. Las FIGURAS 8A-8B muestran tumores hipofisarios teñidos con H&E, y las FIGURAS 8E-8F muestran tumores pancreáticos teñidos con H&E. Las FIGURAS 8C-8D muestran la tinción inmunohistoquímica de tumores hipofisarios *in situ* con marcador panendotelial MECA-32, y las FIGURAS 8G-8H muestran la tinción inmunohistoquímica de tumores de páncreas *in situ* con marcador panendotelial MECA-32.

La FIGURA 8I es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de la densidad vascular en los tumores hipofisarios, y la FIGURA 8J es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de la densidad vascular en los tumores pancreáticos en animales tratados con IgG de control y anti-VEGF. Las barras representan la DE. Ns = no significativo.

Las FIGURAS 9A-9D son una serie de imágenes que muestran que los tumores hipofisarios de ratones Men1<sup>+/-</sup> y trasplantes de tumores hipofisarios se tiñen positivos para la prolactina. Se muestra la tinción inmunohistoquímica para tumores hipofisarios *in situ* (FIGURAS 9A-9B) y los trasplantes subcutáneos de tumores hipofisarios (FIGURAS 9C-9D) con anticuerpo anti-prolactina. La FIGURA 9E y 9F son imágenes que muestran que el tumor hipofisario trasplantado adyacente a la glándula mamaria muestra cambios en la secreción inducida por la prolactina (lado izquierdo de la imagen).

Las FIGURAS 10A-10D muestran que los niveles de prolactina y hormona del crecimiento en suero son elevados en ratones con tumores hipofisarios y trasplantes de tumores hipofisarios. La FIGURA 10A es una gráfica que muestra el nivel de PRL en suero (ng/ml) representado frente al volumen del tumor hipofisario (mm<sup>3</sup>) de 19 ratones Men1<sup>+/-</sup> no tratados, portadores de tumores, ilustrando una correlación positiva. La FIGURA 10B es una gráfica que muestra el nivel de PRL en suero representado frente al volumen del tumor hipofisario de ratones Men1<sup>+/-</sup> tratados con la IgG de control (triángulos negros) y mAb G6-31 (esferas grises) en el punto final del estudio. Las FIGURAS 10C-10D son gráficas que muestran los niveles de prolactina (C) y de hormona del crecimiento (D) en suero de los ratones con trasplantes de adenoma hipofisario el día 1 y el día 35 del tratamiento.

La FIGURA 11 es una gráfica que muestra los efectos del tratamiento anti-VEGF ("intervención") durante la progresión del tumor en fase temprana en el modelo de ratones Rip-TβAg del desarrollo de tumores de los islotes pancreáticos. La gráfica muestra la reducción de la angiogénesis tumoral, medida por el número medio de islotes angiogénicos después del tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF a las 9 a 11 semanas, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo monoclonal de control de isotipo coincidente.

Las FIGURAS 12A y 12B muestran los resultados del ensayo de regresión, en el que no se detectaron diferencias significativas en la carga tumoral ni en la supervivencia entre el tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF y un anticuerpo monoclonal de control de isotipo coincidente en el modelo de ratones Rip-TβAg de desarrollo de tumores de los islotes pancreáticos. La FIGURA 12A es una gráfica que muestra la carga tumoral en los ratones tratados con un anticuerpo anti-VEGF en comparación con los tratados con un anticuerpo monoclonal de control de isotipo coincidente. La FIGURA 12B es una gráfica que muestra la supervivencia a lo largo del tiempo de los ratones tratados con un anticuerpo anti-VEGF en comparación con los tratados con un anticuerpo monoclonal de control de isotipo coincidente.

La FIGURA 13 es una gráfica que muestra la eficacia de la terapia anti-VEGF prolongada para suprimir el nuevo brote de tumores después de la citorreducción con taxanos o gemcitabina.

Las FIGURAS 14A-14D son una serie de imágenes que muestran que el adenoma hipofisario primario sin tratar (FIGURA 14A, encima de la línea de puntos) es variable y débilmente positivo para la hormona del crecimiento en comparación con la hipófisis anterior normal adyacente (por debajo de la línea de puntos). Uno de los cuatro tumores hipofisarios trasplantados (tratado con IgG de control) fue débilmente positivo de la hormona del crecimiento (FIGURA 14B). Los tumores hipofisarios primarios de los ratones tratados con mAb G6-31 (FIGURA 14C) o IgG de control (FIGURA 14D) son focalmente positivos para la hormona del crecimiento.

## Descripción detallada

### I. Definiciones

El término "VEGF" o "VEGF-A" se usa para referirse al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento de células endoteliales vasculares humanos relacionados de 121, 145, 189 y 206 aminoácidos, según lo descrito por, por ejemplo, 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 las formas procesadas de los mismos. VEGF-A forma parte de la familia de genes que incluye el VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PIGF. VEGF-A se une principalmente a dos receptores tirosina quinasa de alta afinidad, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk- 1/KDR), siendo este último el principal transmisor de señales mitogénicas de células endoteliales vasculares del VEGF-A. Además, la neuropilina-1 se ha identificado como un receptor para las isoformas de VEGF-A de unión a la heparina, y puede desempeñar un papel en el desarrollo vascular. El término "VEGF" o "VEGF-A" también se refiere a los VEGF de especies no humanas tales como de ratón, rata o primate. A veces, el VEGF de una determinada especie se indica mediante términos tales como hVEGF para el VEGF humano o mVEGF para el VEGF murino. El término "VEGF" también se usa para hacer referencia a las formas truncadas o los fragmentos polipeptídicos 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 se puede identificar en la presente solicitud, por ejemplo, mediante "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF165". Las posiciones de los aminoácidos para un VEGF nativo "truncado" se numeran como se indica en la secuencia del VEGF nativo. Por ejemplo, la posición del aminoácido 17 (metionina) en el VEGF nativo truncado también es la posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene afinidad de unión por los receptores KDR y Flt-1 comparable al VEGF nativo.

El término "variante de VEGF", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido VEGF que incluye una o más mutaciones de aminoácidos en la secuencia de VEGF nativa. Opcionalmente, las una o más mutaciones de aminoácidos incluyen una o varias sustituciones de aminoácidos. A los efectos de designar de manera abreviada las variantes de VEGF descritas en el presente documento, cabe señalar que los números hacen referencia a la posición del resto de aminoácido a lo largo de la secuencia de aminoácidos del VEGF nativo putativo (proporcionado en Leung *et al.*, *supra* y Houck *et al.*, *supra*).

Un polipéptido de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido obtenido de la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido de origen natural de cualquier mamífero. Dicho polipéptido de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. La expresión polipéptido de "secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), las formas de variantes de origen natural (por ejemplo, las formas cortadas y empalmadas de manera alternativa) y las variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

Una "variante" de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden, o se eliminan, uno o más restos de aminoácidos en el extremo N- o C-terminal del polipéptido. Habitualmente, una variante tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia nativa.

"Actividad biológica de VEGF" incluye la unión a cualquier receptor del VEGF o cualquier actividad de señalización de VEGF como la regulación de la angiogénesis y vasculogénesis normal y anormal (Ferrara y Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543); la potenciación de la vasculogénesis y la angiogénesis embrionarias (Carmeliet *et al.* (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara *et al.* (1996) *Nature* 380:439-442); y la modulación de la proliferación de los vasos sanguíneos cíclicos en el tracto reproductivo femenino y para el crecimiento óseo y la formación de cartilago (Ferrara *et al.* (1998) *Nature Med.* 4:336-340; Gerber *et al.* (1999) *Nature Med.* 5:623-628). Además de ser un factor angiogénico en la angiogénesis y la vasculogénesis, el VEGF, como un factor de crecimiento pleiotrópico, presenta múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos tales como la supervivencia de células endoteliales, la permeabilidad y la vasodilatación de los vasos, la quimiotaxis de los monocitos y la entrada de calcio (Ferrara y Davis-Smyth (1997), *supra* y Cebe-Suarez *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 63:601-615 (2006)). Por otra parte, estudios recientes han informado de efectos mitogénicos del VEGF en unos cuantos tipos de células no endoteliales tales como las células epiteliales pigmentarias de la retina, células del conducto pancreático y células de Schwann. Guerrin *et al.* (1995) *J. Cell Physiol.* 164:385-394; Oberg-Welsh *et al.* (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132; Sondell *et al.* (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740.

En el presente documento, se describe un "antagonista específico del VEGF", en el apartado III.

Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une al VEGF con suficiente afinidad y especificidad. El anticuerpo seleccionado normalmente tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte por VEGF, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a hVEGF con un valor de  $K_d$  de entre 100 nM y 1 pM. Las afinidades de los anticuerpos se pueden determinar mediante un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo BIAcore como se describe en la publicación de solicitud PCT n.º WO2005/012359); ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo, RIA), por ejemplo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF de la invención se puede usar como un agente terapéutico en la dirección e interferencia con enfermedades o afecciones en las que participa la actividad del VEGF. Además, el anticuerpo puede someterse a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso previsto para el anticuerpo. Los ejemplos incluyen el ensayo de inhibición de HUVEC (como se describe en los Ejemplos que se presentan a continuación); ensayos de inhibición del crecimiento de células tumorales (como se describe en el documento WO 89/06692, por ejemplo); ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) (patente de EE.UU. n.º 5.500.362); y ensayos de actividad agonista o hematopoyesis (véase el documento WO 95/27062). Un anticuerpo anti-VEGF, por lo general, no se unirá a otros homólogos de VEGF tales como el VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento tales como PIGF, PDGF o bFGF. Se puede encontrar información adicional acerca de los anticuerpos anti-VEGF en el apartado III, A.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones, la numeración de los restos 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" se refiere a la numeración de los restos del anticuerpo IgG1 UE humano.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre, en concreto, los anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos

(por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada.

5 La "Kd" o "valor de Kd" de acuerdo con la presente invención, en una realización, se mide mediante un ensayo de unión al VEGF radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab del anticuerpo y una molécula de VEGF como se describe mediante el siguiente ensayo, que mide la afinidad de unión en solución de Fab hacia VEGF equilibrando los Fab con una concentración mínima de VEGF(109) marcado con <sup>125</sup>I en presencia de una serie de valoración de VEGF no marcado, a continuación, capturando el VEGF unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de microvaloración (Dyner) durante la noche con 5 ug/ml de un anticuerpo de captura anti-Fab (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y, posteriormente, se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan VEGF(109) marcado con <sup>125</sup>I 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés, por ejemplo, Fab-12 (Presta *et al.*, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Luego, se incuba el Fab de interés durante la noche, aunque la incubación puede continuar durante 65 horas para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, se transfieren las mezclas a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente durante una hora. Después, se retira la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 ul/pocillo de agente de centelleo (MicroScint-20; Packard), y se realiza el recuento de las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos del o igual al 20 % de la unión máxima se seleccionan para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización, la Kd o el valor de Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 con hVEGF(8-109) inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye VEGF humano con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 ug/ml (~0,2 um) antes de la inyección a un caudal de 5 ul/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del VEGF humano, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie con factor de dilución 2 de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 ul/min. Se calculan las velocidades de asociación (K<sub>as</sub>) y las velocidades de disociación (K<sub>dis</sub>) usando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno sencillo (software de evaluación BIAcore, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calculó como la proporción de K<sub>dis</sub>/K<sub>as</sub>. Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si la velocidad de asociación es superior a 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> S<sup>-1</sup> mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de inactivación fluorescente que mida el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-VEGF 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de forma corta de VEGF humano (8-109) o VEGF de ratón medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro dotado de detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

45 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 del VEGF se une al VEGF e inhibe la capacidad del VEGF para inducir la proliferación de células endoteliales vasculares. Los anticuerpos bloqueantes preferidos o anticuerpos antagonistas inhiben completamente la actividad biológica del antígeno.

50 A menos que se indique lo contrario, la expresión "anticuerpo multivalente" se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva para denotar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión al antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo multivalente se diseña para que tenga los tres o más sitios de unión al antígeno y, en general, no es un anticuerpo IgM o IgA de secuencia nativa.

55 Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión al antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera estrechamente asociado, que puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo, en scFv. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. En conjunto, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren especificidad de unión al 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 de unirse al antígeno, aunque normalmente a una afinidad menor que el sitio de unión entero.

60 Como se usa en el presente documento, "dominio variable de anticuerpo" se refiere a las porciones de las cadenas ligera y pesada de moléculas de anticuerpo que incluyen secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) y regiones marco conservadas (FR). V<sub>H</sub> se refiere al dominio variable de la cadena pesada. V<sub>L</sub> se refiere al dominio variable de la cadena ligera. De acuerdo con los métodos usados en la presente invención, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDR y FR se pueden

definir de acuerdo con Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). La numeración de los aminoácidos de los anticuerpos o de los fragmentos de unión al antígeno también se realiza de acuerdo con la de Kabat.

5 Como se usa el presente documento, la expresión "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los restos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo, cuya presencia es necesaria para la unión al antígeno. Cada dominio variable normalmente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de la complementariedad puede comprender restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" según lo definido por Kabat (es decir, aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 10 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, aproximadamente los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de cadena ligera, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del 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 de tanto una región CDR definida de acuerdo con Kabat como de un 15 bucle hipervariable. Por ejemplo, CDRH1 de la cadena pesada del anticuerpo 4D5 incluye los aminoácidos 26 a 35.

Las "regiones marco conservadas" (de aquí en adelante FR) son aquellos restos del dominio variable diferentes de los restos de las CDR. Cada dominio variable normalmente tiene cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los restos de FR de la cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 5-88 (LCFR3) y 98-107 (LCFR4), y los restos de FR de la cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en los restos de la cadena pesada. Si las CDR comprenden restos de aminoácidos de los bucles hipervariables, los restos de FR de la cadena ligera se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) de la cadena ligera, y los restos de FR de la cadena pesada se sitúan aproximadamente en los restos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los restos de la cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende los aminoácidos tanto de una CDR según lo 20 definido por Kabat como de un bucle hipervariable, los restos de FR se ajustarán correspondientemente. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los restos de FR1 de cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los restos de FR2 están en las posiciones 36-49.

El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y un dominio 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)<sub>2</sub> comprenden un par de fragmentos Fab que, en general, están unidos covalentemente cerca de sus extremos carboxi por cisteínas bisagra 35 entre ellos. En la técnica, también se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, que permite al scFv formar la estructura deseada para unirse al antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun, en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994)).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, *Protein Eng*, 8(10):1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto en posibles mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con los preparados de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como aquel obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, y se ha de entender que no requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden preparar

mediante el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una determinada especie o que pertenecen a una clase o subclase determinada de anticuerpos, mientras que el resto de la/s cadena/s es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden realizar para mejorar más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o esencialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o esencialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, 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 de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha producido usando cualquiera de las técnicas de producción de anticuerpos humanos según lo desvelado en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar usando diversas técnicas conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, biblioteca de fagos que 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 también se pueden producir mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja bastante a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento génico, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Dicha metodología se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en 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, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Como alternativa, el anticuerpo humano se puede preparar a través de la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B se pueden extraer de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); y patente de EE.UU. n.º 5.750.373.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que mejoran la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha/s alteración/es. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante el reordenamiento de los dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de restos de CDR y/o restos marco ha sido descrita, por ejemplo, por Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 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 al antígeno funcional" de un anticuerpo es aquel que es capaz de unirse a un antígeno diana. La afinidad de unión del antígeno del sitio de unión al antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo parental del que se obtiene el sitio de unión al antígeno, pero la capacidad de unirse al antígeno se debe poder medir usando uno cualquiera de varios métodos conocidos para la evaluación de la unión del anticuerpo a un antígeno. Por otra parte, la afinidad de unión al antígeno de cada uno de los sitios de unión al antígeno de un

anticuerpo multivalente, en el presente documento, no tiene por qué ser cuantitativamente la misma. Para los anticuerpos multiméricos, en el presente documento, el número de sitios funcionales de unión al antígeno se puede evaluar usando el análisis de ultracentrifugación como se describe en el Ejemplo 2 de la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20050186208. De acuerdo con este método de análisis, se combinan diferentes proporciones del antígeno diana con respecto al anticuerpo multimérico, y se calcula el peso molecular medio de los complejos suponiendo número de sitios de unión funcionales diferentes. Estos valores teóricos se comparan con los valores experimentales reales obtenidos con el fin de 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.

Con el fin de detectar anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo habitual de bloqueo cruzado tal como el descrito en "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988).

Un "anticuerpo dependiente de la especie" es aquel que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión ( $K_d$ ) no superior a aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, preferentemente no superior a aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M y, lo más preferentemente, no superior a aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano, que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1.000 veces más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero normalmente es un anticuerpo humanizado o humano.

Como se usa el presente documento, "anticuerpo mutante" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie, en la que se han modificado uno o más de los restos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de la especie. Dichos mutantes tienen necesariamente una identidad o similitud de secuencia inferior al 100 % con el anticuerpo dependiente de la especie. En una realización, el anticuerpo mutante tendrá una secuencia de aminoácidos que tendrá al menos el 75 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable bien de cadena pesada o de cadena ligera del anticuerpo dependiente de la especie, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, y lo más preferentemente al menos el 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos de la secuencia candidata que son idénticos (es decir, mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácido del mismo grupo basado en propiedades comunes de las cadenas laterales, véase más adelante) a los restos del anticuerpo dependiente de la especie, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Cualquier extensión N-terminal, C-terminal o interna, delección o inserción en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se interpretará como que afecta a la identidad o similitud de las secuencias.

Para aumentar la semivida de los anticuerpos o del polipéptido que contiene las secuencias de aminoácidos de la presente invención, se puede unir al anticuerpo un epítipo de unión al receptor silvestre (especialmente, un fragmento de anticuerpo), como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 5.739.277. Por ejemplo, se puede ligar en marco una molécula de ácido nucleico que codifique el epítipo de unión al receptor silvestre a un ácido nucleico que codifique una secuencia polipeptídica de la presente invención, de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico diseñada comprenda el epítipo de unión al receptor silvestre y una secuencia polipeptídica de la presente invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor silvestre" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG (por ejemplo, Ghetie *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), Tabla 1). Los anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y mayor semivida en suero *in vivo* también se describen en el documento 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 en suero también se puede aumentar, por ejemplo, uniendo otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden unir a albúmina sérica o a una parte de la albúmina sérica que se une al receptor FcRn o un péptido de unión a albúmina sérica, de modo que la albúmina sérica se una al anticuerpo o al polipéptido, por ejemplo, dichas secuencias polipeptídicas se describen en el documento WO01/45746. En una realización, el péptido de albúmina sérica que se va a unir comprende una secuencia de aminoácidos de DICLPRWGGLW. En otra realización, se aumenta la semivida de un Fab mediante estos métodos. Véase también, Dennis *et al.* *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) para las secuencias peptídicas de unión a la albúmina sérica.

Una "proteína quimérica receptora del VEGF" es una molécula receptora del VEGF que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de al menos dos proteínas diferentes, siendo al menos una de ellas como la proteína

receptora del VEGF. En ciertas realizaciones, la proteína quimérica receptora del VEGF es capaz de unirse a e inhibir la actividad biológica de VEGF.

5 Un polipéptido "aislado" o anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido 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 diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido o anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En ciertas realizaciones, el polipéptido o el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de polipéptido o anticuerpo determinado mediante el método de Lowry, y lo más preferentemente, más del 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria; o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o tinción de plata. El polipéptido o anticuerpo aislado incluye el polipéptido o el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido o el anticuerpo aislado se prepararán mediante al menos una etapa de purificación.

20 Por "fragmento" se entiende una parte de un polipéptido o una molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la longitud completa 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.

25 Un "agente antiangiogénico" o "inhibidor de la angiogénesis" se refiere a una sustancia de bajo peso molecular, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhibe la angiogénesis, la vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseada, ya sea directa o indirectamente. Se ha de entender que el agente antiangiogénico incluye aquellos agentes que se unen y bloquean la actividad angiogénica del factor angiogénico o de su receptor. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo o un antagonista de un agente angiogénico definido anteriormente, por ejemplo, los anticuerpos contra el VEGF-A o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor KDR o receptor Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como Gleevec™ (mesilato de imatinib). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores de la angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, la Tabla 3, en la que se enumera la terapia antiangiogénica para el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 5:1359-1364 (1999); Tonini *et al.*, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, la Tabla 2, en la que se enumeran factores antiangiogénicos conocidos) y Sato. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ejemplo, la Tabla 1, en la que se enumeran agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

40 "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen un tumor benigno, precanceroso o no metastásico, así como aquellos en los que se ha de evitar la aparición o reaparición del cáncer.

45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un antagonista específico del VEGF para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso de los tumores precancerosos, benignos o en fase temprana, la cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista específico del VEGF puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y, preferentemente, detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y, preferentemente, detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Para el tratamiento de la latencia o micrometástasis del tumor, la cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista específico del VEGF puede reducir el número o la proliferación de las micrometástasis; reducir o prevenir el crecimiento de un tumor latente; o reducir o prevenir la reaparición de un tumor después del tratamiento o de la eliminación (por ejemplo, usando una terapia contra el cáncer tal como cirugía, radioterapia o quimioterapia). En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* se puede medir, por ejemplo, mediante la evaluación de la duración de la supervivencia, del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), de las tasas de respuesta (RR), de la duración de la respuesta, del tiempo en remisión y/o de la calidad de vida. La cantidad eficaz puede mejorar la supervivencia libre de enfermedad (SLE), mejorar la supervivencia global (SG), disminuir la probabilidad de reaparición, prolongar el tiempo hasta la reaparición, prolongar el tiempo hasta la reaparición distante (es decir, la reaparición fuera del sitio primario), curar el cáncer, mejorar los síntomas del cáncer (por ejemplo, calibrados usando una encuesta específica del cáncer), reducir la aparición de un segundo cáncer primario, etc.

Un cáncer "operable" es un cáncer que está confinado al órgano primario y es adecuado para la cirugía.

65 "Supervivencia" se refiere al paciente que permanece con vida, e incluye la supervivencia libre de enfermedad (SLE), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG). La supervivencia se puede estimar mediante el método de Kaplan-Meier, y cualquier diferencia en la supervivencia se calcula usando la prueba de

rango logarítmico estratificada.

"Supervivencia libre de enfermedad (SLE)" se refiere al paciente que permanece con vida, sin la reaparición del cáncer, por un período de tiempo definido tal como 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 del diagnóstico inicial. En un aspecto de la invención, la SLE se analiza de acuerdo con el principio de intención de tratar, es decir, los pacientes se evalúan basándose en su terapia asignada. Los hechos usados en el análisis de la SLE pueden incluir la reaparición local, regional y distante del cáncer, la aparición de cáncer secundario y la muerte por cualquier causa en pacientes sin un hecho previo (por ejemplo, la reaparición del cáncer de mama o de un segundo cáncer primario).

"La supervivencia global" se refiere al paciente que permanece con vida durante un período 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 subyacentes a la invención, el hecho usado para el análisis de la supervivencia fue la muerte por cualquier causa.

Por "que prolonga la supervivencia" se entiende el aumento de la SLE y/o de la SG en un paciente tratado con respecto a un paciente sin tratar (es decir, con respecto a un paciente no tratado con un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF), o con respecto a un protocolo de tratamiento de control tal como el tratamiento solo con el agente quimioterapéutico, tal como paclitaxel. La supervivencia se monitoriza durante al menos aproximadamente seis 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., tras el inicio del tratamiento o después del diagnóstico inicial.

"Tasa de riesgo", en el análisis de la supervivencia, es un resumen de la diferencia entre dos curvas de supervivencia, que representa la reducción del riesgo de muerte en el tratamiento en comparación con el control, durante un período de seguimiento. La tasa de riesgo es una definición estadística de las tasas de hechos. Para los fines de la invención, la tasa de riesgo se define como la que representa la probabilidad de un hecho en el brazo experimental dividida entre la probabilidad de un hecho en el brazo de control en cualquier punto específico en el tiempo.

El término "simultáneamente" se usa en el presente documento para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, en la que al menos parte de la administración se superpone en el tiempo. Por consiguiente, la administración simultánea incluye una pauta posológica en la que la administración de uno o más agentes continúa tras la interrupción de la administración de uno o más agentes distintos.

Por "monoterapia" se entiende un régimen terapéutico que solamente incluye un único agente terapéutico para el tratamiento del cáncer o tumor en el curso del período de tratamiento. La monoterapia en la que se usa un antagonista específico del VEGF significa que el antagonista específico del VEGF se administra en ausencia de una terapia adicional contra el cáncer durante ese período de tratamiento.

Por "terapia de mantenimiento" se entiende un régimen terapéutico que se administra para reducir la probabilidad de reaparición o progresión de la enfermedad. La terapia de mantenimiento se puede proporcionar durante cualquier período de tiempo, incluyendo los períodos de tiempo prolongados hasta el tiempo de vida del sujeto. La terapia de mantenimiento se puede proporcionar después de la terapia inicial o en combinación con terapias iniciales o adicionales. Las dosis usadas para el tratamiento de mantenimiento pueden variar, y pueden incluir dosis disminuidas en comparación con las dosis usadas para otros tipos de terapia.

"La terapia neoadyuvante" o "terapia preoperatoria", en el presente documento, se refiere a la terapia administrada antes de la cirugía. El objetivo de la terapia neoadyuvante es proporcionar un tratamiento sistémico inmediato, erradicando potencialmente las micrometástasis que, de otro modo, proliferarían si se siguiera el orden convencional de cirugía seguida de terapia sistémica. La terapia neoadyuvante también puede ayudar a reducir el tamaño del tumor, permitiendo así la resección completa de tumores inicialmente no resecables o conservando partes del órgano y de sus funciones. Además, la terapia neoadyuvante permite una evaluación *in vivo* de la eficacia del fármaco, que puede guiar la elección de los tratamientos posteriores.

"La terapia adyuvante", en el presente documento, se refiere a la terapia administrada después de la cirugía, donde no se puede detectar ninguna evidencia de enfermedad residual, para reducir el riesgo de reaparición de la enfermedad. El objetivo de la terapia adyuvante es el de prevenir la reaparición del cáncer y, por lo tanto, reducir la posibilidad de muerte relacionada con el cáncer.

En el presente documento, la quimioterapia "de atención estándar" se refiere a los agentes quimioterapéuticos usados habitualmente para el tratamiento de un determinado cáncer.

"Cirugía definitiva" se usa como la expresión que se usa dentro de la comunidad médica. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, procedimientos, quirúrgicos o de otro tipo, que dan lugar a la eliminación o la resección del tumor, incluyendo aquellos que producen la eliminación o la resección de todo el tumor visible macroscópicamente. La cirugía definitiva incluye, por ejemplo, la resección completa o curativa, o la resección macroscópica completa del tumor. La cirugía definitiva incluye procedimientos que se producen en una o varias fases, e incluyen: por ejemplo, procedimientos quirúrgicos de varias fases, en los que se llevan a cabo uno o más procedimientos quirúrgicos, o de otro tipo, antes de la resección del tumor. La cirugía definitiva incluye procedimientos para eliminar o reseccionar el tumor incluyendo los órganos, partes de órganos y tejidos implicados, así como los órganos circundantes tales como los ganglios linfáticos, partes de órganos o tejidos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Se incluyen en esta definición los cánceres benignos y malignos, así como los tumores latentes o la micrometástasis. Por "cáncer en fase temprana" o "tumor en fase temprana" se entiende que el cáncer no es invasivo ni metastásico o se clasifica como un cáncer en fase 0, I o II.

El término "precanceroso" se refiere a una afección o a un crecimiento que normalmente precede o se desarrolla en un cáncer. Un crecimiento "precanceroso" tendrá células que se caractericen por una regulación del ciclo celular, proliferación o diferenciación anómalas, que se pueden determinar por marcadores de la regulación del ciclo celular, de la proliferación celular o la diferenciación.

Por "displasia" se entiende cualquier crecimiento o desarrollo anómalo de tejido, órganos o células. Preferentemente, la displasia es de alto grado o precancerosa.

Por "metástasis" se entiende la propagación del cáncer desde su sitio primario a otros lugares del cuerpo. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular por el torrente sanguíneo y crecer en un foco distante (metástasis) de tejidos normales de otras partes del cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, depende del desprendimiento de las células tumorales del tumor primario, que se desplazan por el torrente sanguíneo y se detienen en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro sanguíneo y pueden crecer hasta formar una masa potencialmente mortal. Las vías moleculares tanto estimulantes como inhibitorias de la célula tumoral regulan este comportamiento, y la interacción entre la célula tumoral y las células huésped en el sitio distante también son significativas.

Por "micrometástasis" se entiende un pequeño número de células que se han extendido desde el tumor primario a otras partes del cuerpo. La micrometástasis se puede detectar o no en un ensayo de detección o de diagnóstico.

Por "no metastásico" se entiende un cáncer que es benigno o que permanece en el sitio primario y que no ha penetrado en el sistema linfático ni de los vasos sanguíneos, o en tejidos distintos del sitio primario. En general, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que sea un cáncer en fase 0, I o II, y, en ocasiones, un cáncer en fase III.

La referencia a un tumor o a un cáncer en "fase 0", "Fase I", "Fase II", "Fase III" o "Fase IV" indica la clasificación del tumor o del cáncer usando los métodos de agrupación general de fases o de determinación de la fase en números romanos conocidos en la técnica. Aunque la fase real del cáncer depende del tipo de cáncer, en general, un cáncer en fase 0 es una lesión *in situ*, un cáncer en fase I es un tumor pequeño localizado, un cáncer en fase II y en fase III es un tumor avanzado localizado que afecta a los ganglios linfáticos locales, y un cáncer en fase IV representa el cáncer metastásico. Las fases específicas para cada tipo de tumor son conocidas por el médico experto.

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celulares neoplásicos, ya sea maligno o benigno, y todos los tejidos y células precancerosos y cancerosos.

Por "tumor primario" o "cáncer primario" se entiende el cáncer original y no una lesión metastásica situada en otro tejido, órgano o ubicación del cuerpo del sujeto.

Por "tumor benigno" o "cáncer benigno" se entiende un tumor que queda localizado en el sitio de origen y no tiene la capacidad de infiltrarse, invadir o producir metástasis en un sitio distante.

"Reaparición del cáncer", en el presente documento, se refiere a una reaparición del cáncer después del tratamiento, e incluye la reaparición del cáncer en el órgano primario, así como la reaparición a distancia, donde el cáncer reaparece fuera del órgano primario.

Por "latencia del tumor" se entiende un estado de reposo prolongado en el que las células tumorales están presentes, pero la progresión del tumor no es clínicamente evidente. Un tumor latente se puede detectar o no en un ensayo de detección o de diagnóstico.

Por "carga tumoral" se entiende el número de células cancerosas, el tamaño de un tumor o la cantidad de cáncer del cuerpo.

Por "número de tumores" se entiende el número de tumores.

Por "sujeto" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

5 Una "población" de sujetos se refiere a un grupo de sujetos con cáncer, tal como de un ensayo clínico o según lo observado por los oncólogos tras la aprobación de la FDA para una determinada indicación, tal como la terapia neoadyuvante del cáncer. En una realización, la población comprende al menos 3.000 sujetos.

10 La expresión "terapia contra el cáncer" se refiere a una terapia útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen, pero se limitan a, por ejemplo, cirugía, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antigigénicos, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa, inhibidor de HER1/EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, receptores de BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes bioactivos y químicos orgánicos, etc. Las combinaciones de los mismos también se incluyen en la invención.

25 La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo,  $^{131}$ ,  $^{125}$ ,  $^{90}$  y  $^{186}$ Re), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o los fragmentos de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es 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 busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente, bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); 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; esponjistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bifosfonatos tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina y cromoproteínas relacionadas, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del 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, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; eptilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguanina; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxane; rizoxina; sizofiran; ácido tenuazónico de espirogermanio; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, Roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.), ABRAXANE™ exento de Cremophor, formulación de nanopartículas diseñadas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rore Antony, Francia); cloranbucilo; Gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina;

xeloda; ibandronato; irinotecan (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el régimen de tratamiento de irinotecan con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluyendo el régimen de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de la PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapriston y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, fornestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleósido de citosina 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de los genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; vinorelbina y esperamicinas (véase la patente de EE.UU. n.º 4.675.187), y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* y/o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce 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 de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), TAXOL® e inhibidores de la topoisomerasa tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente, la pág. 13.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas, se incluyen hormonas de crecimiento tales como la hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metilado y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento epidérmico; factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; tiorombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-alfa; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, 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 alfa o TNF beta; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

El término "profármaco", como se usa en la presente solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales que el fármaco precursor y que es capaz de ser activado o convertido enzimáticamente en la forma precursora más activa. Véase, por ejemplo, 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 la presente invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfatos, profármacos que contienen tiofosfatos, profármacos que contienen sulfatos, profármacos que contienen péptidos, 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 en una forma de profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

5 Por "radioterapia" se entiende el uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir daño suficiente en una célula con el fin de limitar su capacidad para funcionar normalmente o para destruir la célula por completo. Se apreciará que habrá muchas maneras conocidas en la técnica para determinar la dosis y la duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se dan como una administración de una vez y las dosis típicas varían de 10 a 200 unidades (Grays) al día.

10 Por "reducir o inhibir" se entiende la capacidad de causar una reducción global, preferentemente del 20 % o superior, más preferentemente de 50 % o superior, y lo más preferentemente del 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o superior. Reducir o inhibir se puede referir a los síntomas del trastorno que se está tratando, la presencia o el tamaño de las metástasis o micrometástasis, el tamaño del tumor primario, la presencia o el tamaño del tumor latente, o el tamaño del número de los vasos sanguíneos en los trastornos angiogénicos.

15 Por "oligómero de nucleobases antisentido" se entiende un oligómero de nucleobases, independientemente de la longitud, que es complementario a al menos una parte de la cadena codificante o ARNm de un gen.

20 Por un "oligómero de nucleobases" se entiende un compuesto que incluye una cadena de al menos ocho nucleobases, preferentemente de al menos doce, y lo más preferentemente de al menos dieciséis bases, unidas entre sí por grupos de enlace. Se incluyen en esta definición oligonucleótidos naturales y no naturales, tanto modificados como no modificados, así como los miméticos de oligonucleótidos tales como ácidos nucleicos proteicos, ácidos nucleicos bloqueados y ácidos arabinonucleicos. Se pueden emplear numerosas nucleobases y grupos de enlace en los oligómeros de nucleobases de la invención, incluyendo los descritos en las publicaciones de patente de EE.UU. n.º 20030114412 (véanse, por ejemplo, los párrafos 27-45 de la publicación) y 20030114407 (véanse, por ejemplo, los párrafos 35-52 de la publicación). El oligómero de nucleobases también se puede dirigir a los sitios de inicio y de detención de la traducción. En ciertas realizaciones, el oligómero de nucleobases antisentido comprende de aproximadamente 8 a 30 nucleótidos. El oligómero de nucleobases antisentido también puede contener al menos 40, 60, 85, 120 o más nucleótidos consecutivos que sean complementarios al ARNm o ADN del VEGF, y puede ser tan largo como el ARNm de longitud completa o el gen.

30 Por "ARN pequeño" se entiende cualquier molécula de ARN, ya sea monocatenaria o bicatenaria, que sea de al menos 15 nucleótidos, preferentemente, de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35, nucleótidos de longitud, e incluso hasta de 50 o 100 nucleótidos de longitud (incluidos todos los números enteros intermedios). En ciertas realizaciones, el ARN pequeño es capaz de mediar el ARNi. Como se usa en el presente documento, la expresión "mediar el ARNi" se refiere a la capacidad de distinguir qué ARN han de ser degradados por la maquinaria o proceso de ARNi. Se incluyen en la expresión de ARN pequeño "los RNA de interferencia pequeños" y los "microARN". En general, los microARN (miARN) son ARN pequeños (por ejemplo, de 17-26 nucleótidos), no codificantes monocatenarios que son procesados a partir de ARN horquillados precursores de aproximadamente 70 nucleótidos por Dicer. Los ARN interferentes pequeños (ARNip) son de un tamaño similar y tampoco son codificantes. Sin embargo, los ARNip se procesan a partir de ARNbc largos y suelen ser bicatenarios. Los ARNip también pueden incluir ARN horquillados cortos en los que ambas cadenas de un dúplex de ARNip se incluyen dentro de una sola molécula de ARN. Los ARN pequeños se pueden usar para describir los dos tipos de RNA. Estos términos incluyen ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado (ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante), así como ARN alterado que difiere del ARN de origen natural en la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como en el/los extremo/s del ARN pequeño o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no convencionales, incluyendo nucleótidos o desoxirribonucleótidos de origen no natural. Véase el apartado de "oligómeros de nucleobases" anterior para consultar modificaciones adicionales en la molécula de ácido nucleico. En una realización, las moléculas de ARN contienen un grupo hidroxilo de 3'.

35 La expresión "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un fármaco en la vena de un animal o paciente humano durante un período de tiempo superior a aproximadamente 5 minutos, preferentemente entre aproximadamente 30 y 90 minutos, aunque, de acuerdo con la invención, la infusión intravenosa se administra como alternativa durante 10 horas o menos.

40 La expresión "bolo intravenoso" o "impulso intravenoso" se refiere a la administración del fármaco en una vena de un animal o ser humano de manera que el cuerpo reciba el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, preferentemente en 5 minutos o menos.

45 La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un animal o paciente humano, preferentemente, dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante el suministro relativamente lento y sostenido desde un receptáculo de fármacos. El bolsillo se puede crear pellizcando o estirando de la piel hacia arriba, separándola del tejido subyacente.

65

La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un animal o paciente humano, preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante el suministro relativamente lento y sostenido de un receptáculo de fármacos durante un periodo de tiempo que incluye, pero sin limitación, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión se puede realizar por implantación subcutánea de una bomba de suministro de fármacos implantada bajo la piel del animal o del paciente 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 abarca la duración del régimen de tratamiento.

La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración del fármaco bajo la piel de un animal o paciente humano, donde la administración del fármaco en bolo dura preferentemente menos de aproximadamente 15 minutos, más preferentemente menos de 5 minutos y lo más preferentemente menos de 60 segundos. La administración se realiza preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, donde se crea el bolsillo, por ejemplo, pellizcando o estirando de la piel hacia arriba, separándola del tejido subyacente.

El término "marcador" cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al polipéptido. El marcador puede ser detectable en sí (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o de una composición sustrato que sea detectable.

## II. Uso de antagonistas específicos del VEGF para el tratamiento de tumores en fase temprana, y terapia adyuvante y neoadyuvante

Como se define en las reivindicaciones, la invención se caracteriza por el uso de antagonistas específicos del VEGF para el tratamiento de un sujeto con riesgo de desarrollar cáncer. Por medio de los antecedentes, usando dos enfoques independientes para inhibir VEGF, en concreto, la monoterapia con un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido a VEGF-A y la eliminación genética de VEGF-A, los presentes inventores han demostrado que, usando el modelo de ratón *Apc<sup>min/+</sup>* de formación temprana de adenomas intestinales, la inhibición de la señalización de VEGF es suficiente para que cese el crecimiento del tumor y conferir una mayor supervivencia a largo plazo en un modelo de adenoma intestinal. También se ha demostrado, usando un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido a VEGF-A, que la inhibición de VEGF-A fue suficiente para inhibir el crecimiento de adenomas hipofisarios y reducir el exceso de secreción hormonal en un modelo de ratón de neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN1). Por otra parte, se ha demostrado, usando un modelo de tumor de islote pancreático de ratón (RIP-T $\beta$ Ag) y un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido a VEGF-A, que la inhibición de VEGF provoca una reducción espectacular de la angiogénesis del tumor y, cuando se usa como terapia tras la citorreducción usando cirugía o agentes quimioterapéuticos, suprime el rebrote de los tumores. La divulgación también incluye el uso de antagonistas del VEGF en el tratamiento neoadyuvante y adyuvante.

## III. Antagonistas específicos del VEGF

Un antagonista específico del VEGF se refiere a una molécula (peptídica o no peptídica) capaz de unirse a VEGF, reduciendo los niveles de expresión de VEGF, o neutralizando, bloqueando, inhibiendo, derogando, reduciendo o interfiriendo con las actividades biológicas de VEGF, incluyendo la unión de VEGF a uno o más receptores de VEGF y la angiogénesis mediada por VEGF, y la supervivencia o la proliferación de las células endoteliales. Preferentemente, el antagonista específico del VEGF reduce o inhibe, en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, el nivel de expresión o actividad biológica de VEGF. Preferentemente, el VEGF inhibido por el antagonista específico del VEGF es una isoforma de VEGF o múltiples isoformas de VEGF, por ejemplo, VEGF (8-109), VEGF (1-109), VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>189</sub> o VEGF<sub>206</sub>.

Los antagonistas específicos del VEGF incluyen compuestos peptídicos o no peptídicos que se unen específicamente a VEGF tales como anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, variantes de antagonistas de polipéptidos VEGF, o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a VEGF, y moléculas de receptores y derivados que se unen específicamente a VEGF, secuestrando de ese modo su unión a uno o más receptores (por ejemplo, proteínas receptoras de VEGF solubles, o fragmentos de unión a VEGF de las mismas, o las proteínas quiméricas receptoras de VEGF), proteínas de fusión (por ejemplo, VEGF-Trap (Regeneron)), y VEGF<sub>121</sub>-gelonina (Peregrine). Los antagonistas específicos del VEGF también incluyen oligómeros nucleobásicos antisentido complementarios a al menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF; ARN pequeños complementarios a al menos un fragmento de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF; ribozimas que se dirigen a VEGF; pepticuerpos contra VEGF; y aptámeros de VEGF.

### A. Anticuerpos anti-VEGF

Los anticuerpos anti-VEGF de la invención incluyen cualquier anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, según lo definido en las reivindicaciones, que se unen con la suficiente afinidad y especificidad a VEGF y puede reducir o inhibir la actividad biológica de VEGF. Un anticuerpo anti-VEGF normalmente 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

5 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 anti-VEGF monoclonal A4.6.1 producido por el hibridoma ATCC HB 10709; un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante generado de acuerdo con Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57: 4593-4599, incluyendo, pero sin limitación, el anticuerpo conocido como bevacizumab (BV; Avastin®). Bevacizumab incluye regiones marco conservadas de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de la complementariedad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1  
10 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. Aproximadamente el 93 % de la secuencia de aminoácidos de bevacizumab, incluyendo la mayoría de las regiones marco conservadas, proceden de la IgG1 humana, y aproximadamente el 7 % de la secuencia procede del anticuerpo murino A4.6.1. Bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 Daltons y está glicosilado. Bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen más detalladamente en la patente de EE.UU. n.º 6.884.879, expedida el 26 de febrero 26 de 2005. Los ejemplos adicionales de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos de la serie G6 o B20 (por ejemplo, G6-31 B20-4.1), descritos en la publicación de solicitud PCT n.º WO2005/012359. Para los anticuerpos adicionales, véanse las patentes de EE.UU. n.º 7.060.269, 6.582.959, 6.703.020; 6.342.219; 6.054.297; WO98/45332; WO96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 y 20050112126; y Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, 288:149-164 (2004). Otros ejemplos de anticuerpos que se pueden usar en la invención incluyen aquellos que se unen a un epítipo funcional sobre VEGF humano que comprende los restos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104 o, como alternativa, que comprende los restos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

25 Un anticuerpo de serie G6 de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo anti-VEGF que se obtiene de una secuencia de un anticuerpo G6 o anticuerpo derivado de G6 de acuerdo con una cualquiera de las Figuras 7, 24-26, y 34-35 de la publicación de la solicitud PCT n.º WO2005/012359. En una realización, el anticuerpo de serie G6 se une a un epítipo funcional sobre VEGF humano que comprende los restos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

30 Un anticuerpo de serie B20 de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo anti-VEGF que se obtiene de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado de B20 de acuerdo con una cualquiera de las Figuras 27-29 de la publicación de solicitud PCT n.º WO2005/012359. En una realización, el anticuerpo de serie B20 se une a un epítipo funcional sobre el VEGF humano que comprende los restos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 y C104.

35 Un "epítipo funcional" de acuerdo con la presente invención se refiere a restos de aminoácidos de un antígeno que contribuyen con energía a la unión de un anticuerpo. La mutación de uno cualquiera de los restos que contribuyen con energía del antígeno (por ejemplo, la mutación de VEGF de tipo silvestre por alanina o una mutación homóloga) interrumpirá la unión del anticuerpo de modo que la relación de afinidad relativa ( $CI_{50}$  de VEGF mutante/ $CI_{50}$  de VEGF de tipo silvestre) del anticuerpo será superior a 5 (véase el Ejemplo 2 del documento WO2005/012359). En una realización, la relación de afinidad relativa se determina mediante ELISA de presentación en fagos de unión en solución. En resumen, se recubren inmunoplasmas de 96 pocillos Maxisorp (NUNC) durante la noche a 4 °C con una forma Fab del anticuerpo que se va a ensayar a una concentración de 2 ug/ml en PBS, y se bloquean con PBS, BSA al 0,5 % y Tween 20 al 0,05 % (PBT) durante 2 h a temperatura ambiente. En primer lugar, se incuban diluciones en serie de mutantes puntuales de alanina de hVEGF presentados en fagos (forma de 8-109 restos) o hVEGF de tipo silvestre (8-109) en PBT en las placas recubiertas con Fab durante 15 min a temperatura ambiente, y se lavan las placas con PBS, Tween 20 al 0,05 % (PBST). El fago unido se detecta con un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-M13 y peroxidasa de rábano picante (Amersham Pharmacia) diluido 1:5.000 en PBT, desarrollado con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD ) durante aproximadamente 5 min,  
50 se inactiva con  $H_3PO_4$  1,0 M y se lee espectrofotométricamente a 450 nm. La relación de los valores de  $CI_{50}$  ( $CI_{50}$ , Ala/ $CI_{50}$ , tipo silvestre) representa las veces de reducción de la afinidad de unión (afinidad de unión relativa).

#### B. Moléculas de receptor de VEGF

55 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 murino). La especificidad de cada receptor hacia cada miembro de la familia VEGF varía, pero VEGF-A se une tanto a Flt-1 como a KDR. El receptor Flt-1 de longitud completa incluye un dominio extracelular que tiene siete dominios de Ig, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. El dominio extracelular participa en la unión de VEGF y el dominio intracelular participa en la transducción de señales.

65 Las moléculas receptoras de VEGF, o los fragmentos de las mismas, que se unen específicamente a VEGF se pueden usar para unirse a y secuestrar la proteína VEGF, evitando así que realice la señalización. En ciertas realizaciones, la molécula receptora de VEGF, o el fragmento de unión a VEGF de la misma, es una forma soluble, tal como sFlt-1. Una forma soluble del receptor ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad biológica de la proteína VEGF mediante la unión a VEGF, evitando de ese modo que se una a sus receptores naturales presentes en la

superficie de las células diana. También se incluyen las proteínas de fusión de receptor de VEGF, cuyos ejemplos se describen a continuación.

Una proteína quimérica receptora de VEGF es una molécula receptora que tiene secuencias de aminoácidos derivadas de al menos dos proteínas diferentes, siendo al menos una de las ellas una proteína receptora del VEGF (por ejemplo, el receptor Flt-1 o KDR), que es capaz de unirse e inhibir la actividad biológica de VEGF. En ciertas realizaciones, las proteínas receptoras de VEGF quiméricas consisten en secuencias de aminoácidos derivadas de únicamente dos moléculas receptoras de VEGF diferentes. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o los siete dominios similares a Ig de la región de unión al ligando extracelular del receptor flt-1 y/o del receptor KDR se pueden ligar a secuencias de aminoácidos de otras proteínas no relacionadas, por ejemplo, secuencias de inmunoglobulina. Otras secuencias de aminoácidos con las que se combinan los dominios similares a Ig serán fácilmente evidentes para los expertos habituales en la materia. Los ejemplos de proteínas receptoras de VEGF quiméricas incluyen, por ejemplo, Flt-1/Fc soluble, KDR/Fc o Flt-1/KDR/Fc (también conocido como VEGF Trap). (Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud PCT n.º WO97/44453).

Una proteína receptora de VEGF soluble o proteína receptora de VEGF quimérica incluye proteínas receptoras de VEGF que no se fijan a la superficie de las células a través de un dominio transmembrana. Como tales, las formas solubles del receptor VEGF, incluyendo las proteínas receptoras quiméricas, aunque son capaces de unirse a e inactivar el VEGF, no comprenden un dominio transmembrana y, por lo tanto, en general, no se asocian con la membrana celular de las células en las que se expresa la molécula.

#### C. Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante la hibridación específica de la secuencia al ARN diana complementario, seguida de la escisión endonucleolítica. Los sitios específicos de escisión de ribozimas de una posible diana de ARN se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4: 469-471 (1994) y la publicación de solicitud PCT n.º WO 97/33551. Una ribozima ilustrativa que dirige la expresión de VEGF es Angiozyme™. (Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20060035278).

#### D. Aptámeros

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que forman estructuras terciarias que se unen específicamente a una molécula diana, tal como un polipéptido VEGF. La generación y el uso terapéutico de los aptámeros están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.475.096. Un aptámero de VEGF es un oligonucleótido modificado pegilado, que adopta la conformación tridimensional que le permite unirse al VEGF extracelular. Un ejemplo de un aptámero terapéuticamente eficaz que se dirige a VEGF para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad es pegaptanib (Macugen™, Eyetech, Nueva York). Se puede encontrar información adicional sobre los aptámeros en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20060148748.

#### E. Peptidocuerpos

Un peptidocuerpo es una secuencia peptídica unida a una secuencia de aminoácidos que codifica un fragmento o una parte de una molécula de inmunoglobulina. Los polipéptidos se pueden obtener de secuencias al azar seleccionadas mediante cualquier método de unión específica, incluyendo, pero sin limitación, la tecnología de presentación en fagos. En una realización, el polipéptido seleccionado se puede enlazar a una secuencia de aminoácidos que codifique la porción Fc de una inmunoglobulina. Los peptidocuerpos que se unen específicamente a y antagonizan VEGF también son útiles en los métodos de la divulgación.

#### F. Moléculas de ácidos nucleicos antagonistas específicos del VEGF

Los métodos de la divulgación también presentan el uso de moléculas de ácidos nucleicos antagonistas específicos del VEGF incluyendo oligómeros de nucleobases antisentido y ARN pequeños.

En una realización, la divulgación presenta el uso de oligómeros de nucleobases antisentido dirigidos a ARN de VEGF. Mediante la unión a la secuencia de ácido nucleico complementaria (la cadena sentido o codificante), los oligómeros de nucleobases antisentido son capaces de inhibir la expresión de la proteína presumiblemente a través de la escisión enzimática de la cadena de ARN por la RNasa H.

Un ejemplo de un oligómero de nucleobases antisentido es un oligómero de morfolino. Los morfolinos se usan para bloquear el acceso de otras moléculas a secuencias específicas dentro de las moléculas de ácido nucleico. Pueden bloquear el acceso de otras moléculas a regiones pequeñas (~25 bases) de ácido ribonucleico (ARN). Los morfolinos a veces se denominan PMO, un acrónimo de oligómeros de morfolino fosforodiamidato.

Los morfolidos se usan para desactivar la función génica evitando que las células formen una proteína dirigida o modificando el corte y empalme del pre-ARNm. Los morfolidos son moléculas sintéticas que se unen a secuencias complementarias de ARN por apareamiento de bases de ácido nucleico convencionales. Aunque los morfolidos tienen bases de ácido nucleico convencionales, esas bases se unen a anillos de morfolina en lugar de a los anillos de desoxirribosa y se enlazan a través de grupos fosforodiamidato en vez de fosfatos. La sustitución de fosfatos aniónicos con los grupos fosforodiamidato sin carga elimina la ionización en el intervalo habitual de pH fisiológico, pues los morfolidos en organismos o células son moléculas sin carga.

Los morfolidos actúan mediante el "bloqueo estérico" o la unión a una secuencia diana dentro de un ARN y el bloqueo de moléculas que, de otro modo, podrían interactuar con el ARN. Debido a sus cadenas principales completamente artificiales, los morfolidos no son reconocidos por las proteínas celulares. Las nucleasas no degradan morfolidos, y los morfolidos no activan los receptores de tipo Toll, por lo que no activan las respuestas inmunes innatas tales como el sistema del interferón o la respuesta inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B. Que se sepa, los morfolidos tampoco modifican la metilación del ADN. Por lo tanto, los morfolidos dirigidos a cualquier parte de VEGF que pueda reducir o inhibir los niveles de expresión o la actividad biológica de VEGF son especialmente útiles en los métodos y en las composiciones de la divulgación.

La divulgación también presenta el uso de ARN de interferencia (ARNi) para inhibir la expresión de VEGF. El ARNi es una forma de silenciamiento génico posterior a la transcripción iniciada mediante la introducción de ARN bicatenario (ARNbc). Los ARN bicatenarios cortos, de 15 a 32 nucleótidos, conocidos, en general, como "ARNip", "ARN pequeños" o "microARN" son eficaces en la regulación por disminución de la expresión génica en los nematodos (Zamor *et al.*, *Cell* 101: 25-33) y en líneas celulares de cultivos tisulares de mamíferos (Elbashir *et al.*, *Nature* 411:494-498, 2001). La eficacia terapéutica adicional de este enfoque en los mamíferos fue demostrada *in vivo* por McCaffrey *et al.* (*Nature* 418:38-39, 2002). Los ARN pequeños son de al menos 15 nucleótidos, preferentemente de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 nucleótidos de longitud e incluso de hasta 50 o 100 nucleótidos de longitud (incluyendo todos los números enteros intermedios). Dichos ARN pequeños que son esencialmente idénticos o complementarios a cualquier región del VEGF, se incluyen como antagonistas específicos del VEGF.

Los requisitos y las modificaciones específicos de los ARN pequeños son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud PCT n.º WO01/75164 y en las publicaciones de la solicitud de EE.UU. n.º 200601347877, 20050153918, 20050058982, 20050037988 y 20040203145. En realizaciones particulares, se pueden sintetizar o generar ARNip mediante el procesamiento de ARN bicatenarios más largos, por ejemplo, en presencia de la enzima Dicer en condiciones en las que el ARNbc se procesa en moléculas de ARN de aproximadamente 17 a aproximadamente 26 nucleótidos. Los ARNip también se pueden generar mediante la expresión del fragmento de ADN correspondiente (por ejemplo, una construcción de ADN horquillado). En general, el ARNip tiene los característicos extremos salientes 3' de 2 a 3 nucleótidos, siendo preferentemente (2'-desoxi)timidina o uracilo. Los ARNip normalmente comprenden un grupo hidroxilo 3'. En algunas realizaciones, se usan ARNip monocatenarios o ARNbc de extremos romos. Para mejorar aún más la estabilidad del ARN, los salientes 3' se estabilizan contra la degradación. En una realización, el ARN se estabiliza mediante la inclusión de nucleótidos de purina, tales como adenosina o guanosina. Como alternativa, la sustitución de los nucleótidos de pirimidina con análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de salientes de 2 nucleótidos de uridina por (2'-desoxi)timidina es tolerada y no afecta a la eficacia del ARNi. La ausencia de un grupo hidroxilo 2' mejora significativamente la resistencia del saliente en medio de cultivo tisular.

Las moléculas de ARNip se pueden obtener a través de varios protocolos, incluyendo la síntesis química o la producción recombinante usando un sistema de *Drosophila in vitro*. Se pueden obtener en el mercado de compañías tales como Dharmacon Research Inc. o Xeragon Inc., o se pueden sintetizar usando kits disponibles en el mercado, tales como el kit de construcción de ARNip *Silencer*<sup>TM</sup> de Ambion (número de catálogo 1620) o el kit de transcripción de ARNi *HiScribe*<sup>TM</sup> de New England Biolabs (número de catálogo E2000S).

Como alternativa, el ARNip se puede preparar usando procedimientos convencionales para la transcripción *in vitro* del ARN y procedimientos de hibridación de ARNbc, tales como los descritos en Elbashir *et al.* (*Genes & Dev.* 15:188-200,2001), Girard *et al.* (*Nature* 442:199-202 (2006)), Aravin *et al.* (*Nature* 442:203-207 (2006)), Grivna *et al.* (*Genes Dev.* 20:1709-1714 (2006))) y Lau *et al.* (*Science* 313:363-367 (2006)).

También se pueden usar ARN horquillados cortos (ARNhc), descritos en Yu *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU.*, 99:6047-6052, 2002) o Paddison *et al.* (*Genes & Dev.*, 16:948-958, 2002). Los ARNhc están diseñados de manera que se incluyen cadenas tanto sentido como antisentido dentro de una sola molécula de ARN y se conectan por un bucle de nucleótidos (3 o más). Los ARNhc puede sintetizarse y purificarse usando la síntesis de transcripción de T7 *in vitro* convencional como se ha descrito anteriormente y en Yu *et al.*, *supra*. Los ARNhc también pueden subclonarse en un vector de expresión que tenga las secuencias del promotor U6 de ratón, que luego puede transfectarse a células y usarse para la expresión *in vivo* del ARNhc.

Hay varios métodos disponible para la transfección o introducción de ARNbc en células de mamífero. Por ejemplo, hay varios reactivos de transfección disponibles en el mercado que son útiles para la transfección a base de lípidos

de ARNip incluyendo, pero sin limitación, TransIT-TKO™ (Mirus, n.º de catálogo MIR 2150), Transmessenger™ (Qiagen, n.º de catálogo 301525), Oligo-fectamine™ y Lipofectamine™ (Invitrogen, n.º de catálogo MIR 12252-011 y n.º de catálogo 13778-075), siPORT™ (Ambion, n.º de catálogo 1631), DharmaFECT™ (Fisher Scientific, n.º de catálogo T-2001-01). También hay agentes disponibles en el mercado para los métodos basados en la electroporación para la transfección de ARNip, tales como siPORTer™ (Ambion Inc. n.º de catálogo 1629). También se pueden usar técnicas de microinyección. El ARN pequeño también puede transcribirse a partir de una construcción de expresión introducida en las células, donde la construcción de expresión incluye una secuencia de codificación para transcribir el ARN pequeño, unida operativamente a una o más secuencias reguladoras de la transcripción. Cuando se desee, también se pueden usar plásmidos, vectores o vectores virales para la administración de ARNbc o ARNip, y dichos vectores son conocidos en la técnica. Los protocolos para cada reactivo de transfección están disponibles desde el fabricante.

#### IV. Usos terapéuticos

A pesar de la amplia información sobre el papel del VEGF en la angiogénesis, se sabe relativamente poco sobre el papel de VEGF en los cánceres benignos, precancerosos o no metastásicos, o en el entorno adyuvante o neoadyuvante. Los presentes inventores han descubierto que los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar para el tratamiento de cánceres benignos, precancerosos o no metastásicos; para el tratamiento de tumores latentes o micrometástasis; para la prevención de la reaparición o del rebrote de tumores; o para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer. Los antagonistas específicos del VEGF también se pueden usar para la terapia adyuvante para el tratamiento de un sujeto con cáncer no metastásico, después de la cirugía definitiva o para la terapia neoadyuvante para el tratamiento de un sujeto con un cáncer operable que se presta el tratamiento antes de la extirpación quirúrgica de cáncer operable en el sujeto. Aunque las aplicaciones terapéuticas se separan a continuación en tratamiento, prevención, terapia neoadyuvante y terapia adyuvante, el experto en la materia apreciará que estas categorías no son necesariamente excluyentes entre sí.

##### A. Clasificación de los tumores

El término cáncer engloba un conjunto de trastornos proliferativos, incluyendo, pero sin limitación, crecimientos precancerosos, tumores benignos, tumores malignos y tumores latentes. Los tumores benignos permanecen localizados en el lugar de origen y no tienen la capacidad de infiltrarse, invadir ni hacer metástasis en sitios distantes. Los tumores malignos invadirán y dañarán otros tejidos que los rodean. También pueden adquirir la capacidad de desprenderse del sitio original y propagarse a otras partes del cuerpo (metástasis), en general, a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático, en el que se encuentran los ganglios linfáticos. Los tumores latentes son tumores en reposo en los que las células tumorales están presentes, pero la progresión del tumor no es clínicamente evidente.

Los tumores primarios se clasifican según el tipo de tejido del que proceden; los tumores metastásicos se clasifican según el tipo de tejido del que derivan las células cancerosas. Con el tiempo, las células de un tumor maligno se vuelven más anormales y se parecen menos a las células normales. Este cambio de aspecto de las células cancerosas se denomina grado tumoral, y las células cancerosas se describen como bien diferenciadas (de grado bajo), moderadamente diferenciadas, mal diferenciadas o indiferenciadas (alto grado). Las células bien diferenciadas tienen un aspecto bastante normal y se asemejan a las células normales de las cuales se originaron. Las células indiferenciadas son células que se han vuelto tan anómalas que ya no es posible determinar su origen.

Los sistemas de determinación de la fase del cáncer describen cuánto se ha diseminado el cáncer anatómicamente, e intentan poner a los pacientes con pronóstico y tratamiento similares en el mismo grupo de determinación de fase. Se pueden realizar diversos ensayos para ayudar a determinar la fase del cáncer, incluyendo la biopsia y ciertos ensayos de generación de imágenes tales como radiografía de tórax, mamografía, gammagrafía ósea, tomografía computarizada y resonancia magnética. Los análisis de sangre y una evaluación clínica también se usan para evaluar el estado de salud general del paciente y detectar si el cáncer se ha propagado a ciertos órganos.

Para determinar la fase del cáncer, el Comité Conjunto sobre el Cáncer de EE.UU. sitúa en primer lugar el cáncer, en particular, los tumores sólidos, en una categoría de letra usando el sistema de clasificación TNM. Los cánceres se designan con la letra T (tamaño del tumor), N (nódulos linfáticos palpables) y/o M (metástasis). T1, T2, T3 y T4 describen el aumento de tamaño de la lesión primaria; N0, N1, N2, N3 indican la implicación de los ganglios en avance progresivo; y M0 y M1 reflejan la ausencia o la presencia de metástasis a distancia.

En el segundo método de determinación de la fase, también conocido como agrupación general de fases o determinación en números romanos, los cánceres se dividen en las fases 0 a IV, incorporando el tamaño de las lesiones primarias, así como la presencia de diseminación ganglionar y de metástasis a distancia. En este sistema, los casos se agrupan en cuatro fases indicadas por los números romanos del I al IV, o se clasifican como "recurrentes". Para algunos tipos de cáncer, la fase 0 se denomina "in situ" o "Tis", tal como el carcinoma ductal *in situ* o el carcinoma lobular *in situ* para los cánceres de mama. Los adenomas de alto grado también se pueden clasificar como fase 0. En general, los cánceres en fase I son cánceres pequeños localizados que suelen ser curables, mientras que la fase IV suele representar un cáncer inoperable o metastásico. Los cánceres en fase II y III

suelen estar avanzados a nivel local y/o presentar la participación de los ganglios linfáticos locales. En general, las fases de números más altos indican una enfermedad más extendida, incluyendo un mayor tamaño del tumor y/o propagación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos y/o a los órganos adyacentes al tumor primario. Estas fases están definidas con precisión, pero la definición es diferente para cada tipo de cáncer, como el experto en la materia sabe.

Muchos registros del cáncer, tales como el programa de vigilancia, epidemiología y resultados finales (SEER) del NCI, usan la determinación de la fase del sumario. Este sistema se usa para todo tipo de cáncer. Agrupa los casos de cáncer en cinco categorías principales:

*In situ* es cáncer temprano que solo está presente en la capa de células en la que comienza.

*Localizado* es cáncer que se limita al órgano en el que comenzó, sin evidencia de diseminación.

*Regional* es el cáncer que se ha diseminado más allá del sitio original (primario) a los ganglios linfáticos u órganos y tejidos cercanos.

*Distante* es el cáncer que se ha diseminado desde el sitio primario a órganos distantes o a los ganglios linfáticos distantes.

*Desconocido* se usa para describir los casos para los que no hay suficiente información para indicar una fase.

Además, es común que el cáncer vuelva en meses o en años de haberse extirpado el tumor primario. El cáncer que se repite una vez erradicado todo el tumor visible se denomina enfermedad recurrente. La enfermedad que se repite en la zona del tumor primario es localmente recurrente, y la enfermedad que se repite como metástasis se denomina reaparición distante. Un tumor latente es un tumor que existe en un estado de reposo, en el que las células tumorales están presentes, pero la progresión del tumor no es clínicamente evidente. Las micrometástasis son una pequeña metástasis o una serie de células que se han extendido desde el tumor primario a otras partes del cuerpo. Las micrometástasis se pueden detectar o no en un ensayo de detección o de diagnóstico. Los métodos de la divulgación son útiles para la prevención de la aparición de tumores latentes o micrometástasis, o de la reaparición del tumor, por ejemplo, en un entorno en el que haya un tumor latente o micrometástasis, pero que se pueda o no detectar clínicamente.

Los métodos de la divulgación también son útiles para el tratamiento de cánceres tempranos, incluyendo pero sin limitación, tumores benignos, precancerosos o no metastásicos. Esto incluye cualquier tumor en fase 0, I o II; cualquier tumor no metastásico en fase II; cualquier afección que normalmente precede o se desarrolla en un cáncer, incluyendo, pero sin limitación, la displasia; y cualquier tumor que permanece localizado en el lugar de origen y no se ha infiltrado, invadido o formado metástasis en sitios distantes. Los ejemplos de tumores benignos, precancerosos o no metastásicos incluyen un pólipo, adenoma, fibroma, lipoma, gastrinoma, insulinooma, condroma, osteoma, hemangioma, linfangioma, meningioma, leiomioma, rabdomioma, papiloma de células escamosas, neuromas acústicos, neurofibromas, cistadeno de las vías biliares, leiomiomas, mesoteliosomas, teratomas, mixomas, tracomias, granulomas, hamartoma, papiloma de células transicionales, adenoma pleyomórfico de la glándula salival, tumores desmoides, cisipapiloma dermoide, cistadenoma, hiperplasia nodular focal e hiperplasia nodular regenerativa.

Dado que la angiogénesis participa tanto en el crecimiento del tumor primario como en la metástasis, el tratamiento antiangiogénico proporcionado por la invención es capaz de inhibir el crecimiento neoplásico del tumor en el sitio principal, así como de prevenir la metástasis de los tumores en los sitios secundarios, permitiendo así el ataque de los tumores por otros productos terapéuticos. Los ejemplos de cáncer que se van a tratar en el presente documento incluyen tanto los tumores sólidos como los no sólidos o de tejidos blandos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas; cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón); cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal); cáncer de páncreas; glioblastoma; cáncer de cuello uterino; cáncer de ovario; cáncer de hígado; cáncer de vejiga; hepatoma; cáncer de mama; cáncer de colon; cáncer colorrectal; carcinoma de endometrio o de útero; carcinoma de glándulas salivares; cáncer de riñón o renal; cáncer de hígado; cáncer de próstata; cáncer de vulva; cáncer de tiroides; carcinoma hepático; y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no Hodgkin folicular (LNH)/de bajo grado; LNH linfocítico pequeño; LNH folicular/grado intermedio; LNH difuso de grado intermedio; LNH inmunoblástico de alto grado; LNH linfoblástico de alto grado; LNH de células pequeñas no escindidas de alto grado LNH; LNH de enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia de células vellosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada con la facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales) y síndrome de Meigs. Más concretamente, los cánceres que son susceptibles al tratamiento mediante los antagonistas específicos del VEGF de la invención incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma no de Hodgkin (LNH), cáncer de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, tumores cerebrales, gliomas (por ejemplo, astrocitoma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, glioblastoma multiforme), melanoma, cáncer de ovario,

mesotelioma y mieloma múltiple. Más preferentemente, la invención es para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal en un paciente humano.

### **B. Adenomas**

5 En una realización, la invención se refiere al tratamiento de un tumor de células epiteliales benigno conocido como adenoma. Un adenoma es un tumor benigno que tiene un origen glandular. Los adenomas normalmente se originan a partir de células epiteliales usadas para la secreción. Las células epiteliales se encuentran en todo el organismo, pero solo un subconjunto de dichas células se usa para la secreción. Las células epiteliales que se usan para la secreción constituyen partes específicas del organismo conocidas como glándulas. Las glándulas tienen la tarea de formar una serie de sustancias en el organismo incluyendo, pero sin limitación, el sudor, la saliva, la leche materna, mucosidades y hormonas. Un adenoma se puede formar a partir de la mayoría de las células glandulares del organismo.

15 Un adenoma se puede formar de una manera similar a un tumor maligno o canceroso. Los adenomas son benignos y, por lo tanto, no hacen metástasis ni se extienden a otros órganos o tejidos. Aunque la mayoría de los adenomas permanecen benignos, algunos adenomas pueden convertirse en tumores malignos y, si esto ocurre, el adenoma maligno recién formado se denomina adenocarcinoma. Por ejemplo, los cánceres de colon y de recto pueden comenzar como adenomas o pólipos y convertirse más tarde en adenocarcinomas; los adenomas bronquiales pueden convertirse en cáncer de pulmón.

20 Con frecuencia, los adenomas tienen un efecto notable en los órganos o en el tejido glandular en los que se desarrollan. A menudo, los adenomas secretan niveles excesivos de hormonas. Cuando esto ocurre, los efectos pueden ser bastante incómodos para la persona afectada. En ciertas situaciones, los efectos pueden ser potencialmente mortales. Sin embargo, algunos adenomas se desarrollan sin efectos demostrables.

25 Hay ciertos tipos de adenomas que son más comunes en las mujeres, tales como los adenomas del hígado. Otros, tales como los adenomas de colon, son más comunes en los adultos de edad avanzada, por ejemplo, de más de cincuenta años. Además, hay factores que predisponen a un paciente al desarrollo de un adenoma. Por ejemplo, las mujeres que toman anticonceptivos orales pueden estar en mayor riesgo de desarrollar adenomas hepáticos. Ciertos tipos de adenomas, por ejemplo, los adenomas de colon, pueden ser hereditarios.

30 Los síntomas relacionados con los adenomas varían ampliamente. Por ejemplo, un adenoma de mama, denominado fibroadenoma, normalmente no causa síntomas y puede ser tan pequeño que la persona afectada sea incapaz de detectarlo. Otros adenomas de mama, sin embargo, pueden ser lo suficientemente grandes como para ser perceptibles al tacto. Por el contrario, un adenoma de pulmón puede causar escalofríos febriles, falta de aliento y tos con sangre.

35 Los adenomas se diagnostican usando varias técnicas, incluyendo la recogida de muestras de sangre y de orina, ecografía, tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (MRI). Las biopsias se emplean normalmente para determinar si el tumor es benigno o maligno. La invención es particularmente útil para la prevención de los adenomas en un sujeto según lo definido en las reivindicaciones, que tenga cualquiera de los factores de riesgo asociados con los adenomas.

### **45 C. Tumores gastrointestinales**

En otra realización, la invención se usa para el tratamiento de un tumor gastrointestinal benigno, precanceroso o no metastásico. Esto incluye cualquier tumor en fase 0, I o II; cualquier tumor o afección que normalmente precede o se convierte en un cáncer gastrointestinal; y cualquier tumor gastrointestinal que permanece localizado en el lugar de origen y no se ha infiltrado, invadido ni hecho metástasis en sitios distantes. Se incluyen en los tumores gastrointestinales cualquier pólipo, adenoma, tumor o cáncer del sistema digestivo, específicamente del esófago, estómago, hígado, vías biliares (conductos biliares de la vesícula biliar, ampolla de Vater), intestinos, páncreas, colon, recto y ano. Estos se describen en detalle a continuación.

#### **55 (i) Cáncer anal**

El cáncer anal es un tumor maligno ya sea del canal anal o del borde anal. Con frecuencia, el cáncer anal comienza como displasia anal. La displasia anal se compone de células del ano que tienen cambios anómalos, pero que no muestran evidencia de invasión en el tejido circundante. La forma más grave de displasia anal se denomina carcinoma *in situ*, en el que las células aparecen como células cancerosas, pero no han invadido más allá de donde se encuentran las células normales. Con el tiempo, la displasia anal finalmente cambia hasta el punto en que las células se vuelven invasivas y adquieren la capacidad de hacer metástasis, o de desprenderse a otras partes del organismo. La displasia anal a veces se denomina neoplasia intraepitelial anal (NIA). Cuando el cáncer anal se propaga, por lo general, es a través de la invasión directa del tejido circundante o a través del sistema linfático. La propagación del cáncer anal a través de la sangre es menos común, aunque puede ocurrir.

Se han asociado varios factores con el cáncer anal. Lo más importante, la infección con el virus del papiloma humano (VPH) ha demostrado estar relacionada con los cánceres anales y se ha asociado con otros varios tipos de cáncer incluyendo el cáncer de cuello uterino, y los cánceres de cabeza y cuello. Otro virus de transmisión sexual, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha relacionado con los cánceres de ano, y los individuos infectados con el VIH tienen un mayor riesgo de infección con el VPH. Dado que el cáncer anal parece iniciarse primero como displasia anal antes de progresar a cáncer anal, los pacientes con antecedentes de NIA están en mayor riesgo de desarrollar cáncer anal. Además, parece que hay una mayor tasa de cáncer anal en pacientes que sufren enfermedades anales benignas tales como fístulas anales, fisuras anales, abscesos perianales o hemorroides.

5  
10 La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer anal en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tenga cualquiera de los factores de riesgo asociados con el cáncer anal.

(II) Cánceres colorrectales y rectales

15 El colon es la parte más larga del intestino grueso. El cáncer de colon es el tercer tipo más común de cáncer, tanto en varones como en mujeres, en el mundo occidental. La incidencia es mayor en los afroamericanos, que también son más propensos a morir de la enfermedad. El riesgo del cáncer de colon aumenta sustancialmente después de los 50 años de edad, pero cada año hay numerosos casos informados de personas más jóvenes. En general, los cánceres de colon y recto se agrupan, y tienen los mismos factores de riesgo asociados. Las personas con antecedentes personales o familiares de cáncer de colon, pólipos o síndromes de cáncer de colon hereditario (por ejemplo, PAF y HNPCC), así como los pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, están en mayor riesgo y pueden requerir un reconocimiento a una edad más temprana que la población general. Una persona con un pariente de primer grado (padre, hermano o hijo) con cáncer de colon tiene de 2 a 3 veces más probabilidades de desarrollar el cáncer que una persona que no tenga un familiar afectado.

20  
25 Los cánceres de colon se pueden diagnosticar usando varias técnicas conocidas para el clínico. Las pruebas de detección son el método más eficaz para diagnosticar el cáncer de colon en las fases tempranas (por ejemplo, pólipos o adenomas), ya que estas fases no suelen estar asociadas con ningún síntoma. En general, es cuando el pólipo crece hasta convertirse en un tumor cuando puede sangrar u obstruir el colon causando síntomas. Estos síntomas incluyen el sangrado por el recto, sangre en las heces o en el inodoro después de una deposición, un cambio en la forma de las heces (es decir, adelgazamiento), dolor por calambres en el abdomen y sensación de necesidad de ir al baño cuando no es necesario. Para los tumores y pólipos que pueden sangrar de forma intermitente, la sangre se puede detectar en muestras de heces mediante una prueba denominada prueba de sangre oculta en heces (FOBT). Por sí misma, la FOBT solo encuentra aproximadamente el 24 % de los cánceres. También se puede usar una sigmoidoscopia flexible o una colonoscopia para diagnosticar el cáncer colorrectal.

35 En general, el cáncer colorrectal se clasifica de la siguiente forma:

40 Fase 0 (también denominada carcinoma *in situ*) - el cáncer está confinado a la parte más exterior de la pared del colon.  
Fase I - el cáncer se ha diseminado a la segunda y tercera capa de la pared del colon, pero no a la pared del colon exterior ni más allá. Esto también se denomina cáncer de colon A de Dukes.  
Fase II - el cáncer se ha diseminado a través de la pared del colon, pero no ha invadido los ganglios linfáticos (se trata de estructuras pequeñas que ayudan en la lucha contra la infección y la enfermedad). Esto también se denomina cáncer de colon B de Dukes.  
45 Fase III - el cáncer se ha diseminado a través de la pared del colon y en los ganglios linfáticos, pero no se ha propagado a otras zonas del organismo. Esto también se denomina cáncer de colon C de Dukes.  
Fase IV - el cáncer se ha diseminado a otras zonas del organismo (es decir, hígado y pulmones). Esto también se denomina cáncer de colon D de Dukes.

50 La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer colorrectal en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tenga cualquiera de los factores de riesgo de cáncer colorrectal, tales como los descritos anteriormente.

55 (iii) Cáncer de esófago

El esófago es un tubo muscular que conecta la garganta con el estómago. La gran mayoría de los cánceres de esófago se desarrollan a partir del revestimiento interno (mucosa) del esófago y no de las células musculares o de cartílago que componen el resto del esófago. El revestimiento del esófago es algo único, ya que cambia a medida que va avanzando desde la garganta hasta el estómago. En la parte superior del esófago (proximal), el revestimiento del esófago se asemeja al revestimiento de la garganta, compuesto de células escamosas. Por lo tanto, cuando se desarrollan cánceres en esta región, por lo general, son carcinomas de células escamosas. En la parte inferior del esófago (distal), el tipo más común de cáncer es el adenocarcinoma.

65 Además de los cánceres invasivos, los pacientes a veces son diagnosticados con lesiones precancerosas, denominadas carcinoma *in situ*. Estas lesiones precancerosas se pueden ver antes del desarrollo de cualquier

carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma. El carcinoma *in situ* se produce cuando el revestimiento del esófago sufre cambios similares a los cambios cancerosos sin invasión en los tejidos más profundos. Por lo tanto, aunque las propias células tienen cualidades similares al cáncer, no hay riesgo de propagación, pues no se ha producido invasión. Otro tipo de lesión que se considera precursora del cáncer en sí se denomina esófago de Barrett, que se explica en profundidad a continuación.

El cáncer de esófago se produce en aproximadamente 13.500 estadounidenses al año, causando aproximadamente 12.500 muertes. La mayoría de los pacientes son diagnosticados con 50 o 60 años, con aproximadamente cuatro veces más hombres diagnosticados que mujeres. En el pasado, la gran mayoría (85 %) de los cánceres de esófago diagnosticados fueron cánceres de células escamosas producidos en la parte superior del esófago. Los factores de riesgo para este tipo de cáncer incluyen el consumo de alcohol y de tabaco. Aunque se cree que son factores de riesgo independientes (siendo el tabaquismo peor), parece que hay un efecto sinérgico entre los dos para el desarrollo del cáncer de esófago. Otros posibles agentes carcinógenos para el desarrollo del carcinoma de células escamosas del esófago son las nitrosaminas, las fibras de asbesto y los productos derivados del petróleo.

Esto contrasta con el grupo de pacientes en riesgo de adenocarcinoma, normalmente, de la parte inferior del esófago. El adenocarcinoma antes era una enfermedad menos frecuente en comparación con el carcinoma de células escamosas. Sin embargo, últimamente, se ha hecho aún más frecuente que el carcinoma de células escamosas. Se cree que el adenocarcinoma, en general, surge en el contexto del esófago de Barrett, que es una afección en la que el revestimiento normal del esófago se reemplaza por un revestimiento que se asemeja al estómago. El esófago de Barrett se diagnostica mediante endoscopia, en la que se usa una cámara de fibra óptica para observar el esófago en sentido descendente y la biopsia de cualquier área sospechosa. Se cree que el esófago de Barrett está causado por la exposición crónica de la parte inferior del esófago al ácido gástrico. Esta exposición ocurre en pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), que provoca síntomas en los pacientes de ardor de estómago, hinchazón, pérdida de apetito o dolor de estómago con alimentos o por la noche mientras se duerme. Los pacientes con ERGE crónica están en riesgo de desarrollar esófago de Barrett y, por lo tanto, están en riesgo de desarrollar adenocarcinoma de esófago.

Aunque el esófago de Barrett, por definición, se produce cuando el revestimiento del esófago es anormal, puede haber diferentes grados de las anomalías. Se clasifican en términos de displasia, que se usa para determinar la probabilidad de que el esófago de Barrett progrese a un cáncer. Los pacientes con esófago de Barrett que tienen displasia de alto grado deben recibir un seguimiento por endoscopia cada 3 meses o incluso recibir tratamiento, ya que se consideran cambios premalignos que tienen una alta probabilidad de progresar a cáncer. La prueba más sensible para documentar el cáncer de esófago local o la displasia es la endoscopia. Con la endoscopia, se puede observar el área de interés del esófago directamente con la cámara de fibra óptica, y se pueden visualizar la ubicación de la anomalía, la presencia o ausencia de sangrado y la cantidad de obstrucción. La realización de una laringoscopia (observación de la garganta) o una broncoscopia (observación de la tráquea y las vías respiratorias) también puede ser necesaria dependiendo de la ubicación y de la extensión del cáncer de esófago. El nivel de atención hoy en día también incluye la realización de una ecografía durante la endoscopia, denominada ecografía endoscópica (EUS). Por lo general, se realizan una tomografía computarizada, una prueba de ingesta de bario, una radiografía y otras pruebas adicionales de rutina, incluyendo análisis de sangre, para el diagnóstico y la determinación correcta de la fase del cáncer.

La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer de esófago en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tiene cualquiera de los factores de riesgo asociados con el cáncer de esófago, tales como los descritos anteriormente.

*(iv) Cáncer de la vesícula biliar*

La vesícula biliar es un pequeño órgano en forma de pera que almacena y concentra la bilis. La vesícula biliar y el hígado están conectados por el conducto hepático. El cáncer primario de la vesícula biliar afecta a aproximadamente 6.000 adultos en EE.UU. al año. La mayoría de estos cánceres son adenocarcinomas, con subtipos tales como papilar, nodular y tubular, dependiendo del aspecto de las células tumorales en el microscopio. Los subtipos menos comunes incluyen de células escamosas, de células en anillo de sello y adenoescamoso (adenoacantoma).

El cáncer de vesícula biliar se observa con mayor frecuencia en pacientes de mayor edad, con una edad media al diagnóstico de 62-66 años. Es más frecuente en las mujeres, con una proporción de mujeres con respecto a varones de aproximadamente 3:1.

La causa del cáncer de vesícula biliar es desconocida, aunque se ha asociado con los cálculos biliares, niveles altos de estrógeno, tabaquismo, alcohol, obesidad y el género femenino. Además, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) son 10 veces más propensos a desarrollar cáncer del tracto biliar extrahepático.

En general, el cáncer de la vesícula biliar se diagnostica a partir del historial clínico y examen físico, y de labores de laboratorio que incluyen paneles de química metabólica y función hepática en busca de niveles anómalos de

diversas sustancias en la sangre que sean indicativos de la enfermedad hepatobiliar general. Normalmente, se hace un análisis de orina para evaluar los niveles en orina de algunas de estas sustancias. También se pueden usar otras técnicas tales como la ecografía, resonancia magnética, colangiografía y tomografías computarizadas.

5 La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer de la vesícula biliar en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tiene cualquiera de los factores de riesgo asociados con el cáncer de la vesícula biliar, tales como los descritos anteriormente.

(v) *Cáncer gástrico*

10 El cáncer gástrico es el cáncer del estómago. En Estados Unidos, el cáncer gástrico se sitúa ahora como el decimocuarto cáncer más común. Es raro encontrarse con un cáncer gástrico antes de los 40 años de edad, y su incidencia aumenta con la edad a partir de entonces.

15 Más del 90 % de los cánceres gástricos aparecen en el revestimiento del estómago. Dado que este revestimiento tiene glándulas, el cáncer que procede del mismo se denomina adenoma o, para las formas más avanzadas, adenocarcinoma. Aunque hay otros tipos de cáncer que pueden surgir en el estómago (linfomas a partir del tejido linfático, leiomiomas a partir del tejido muscular, carcinoma de células escamosas a partir del revestimiento sin glándulas), la gran mayoría son adenocarcinomas.

20 Los estudios también han relacionado la infección con *Helicobacter pylori* con el cáncer gástrico. *H. pylori* se asocia con la úlcera gástrica y la gastritis atrófica crónica, lo que puede explicar la alta incidencia del cáncer gástrico en pacientes infectados con *H. pylori*. Sin embargo, la función exacta de *H. pylori* en el desarrollo del cáncer gástrico sigue siendo poco clara.

25 Se usa varias pruebas para identificar con precisión el cáncer gástrico, incluyendo radiografías de bario de doble contraste (denominadas "IG superiores" o "tragos de bario") y endoscopias superiores. Para el diagnóstico del cáncer gástrico, se usan otros procedimientos que incluyen la tomografía computarizada, el PET y la laparoscopia.

30 La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer gástrico en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tenga cualquiera de los factores de riesgo asociados con el cáncer gástrico, tales como los descritos anteriormente.

(vi) *Cáncer de hígado*

35 Hay una serie de tumores hepáticos benignos. Los hemangiomas son los tumores benignos más frecuentes del hígado, y se producen cuando se forma un tumor, lleno de sangre, benigno en el hígado. Otros tumores benignos incluyen adenomas e hiperplasia nodular focal. Aunque estos tumores no invaden los tejidos circundantes ni hacen metástasis, suele ser difícil distinguir entre los tumores benignos y malignos en las imágenes radiográficas.

40 El carcinoma hepatocelular (CHC), un tipo de cáncer que surge de los hepatocitos, es el tipo más común de cáncer primario de hígado, y representa alrededor del 70 % de todos los cánceres de hígado. Los cánceres que surgen de los conductos biliares del hígado se conocen como colangiocarcinomas, y representan el 10-20 % de todos los cánceres de hígado. Estos cánceres pueden surgir de los conductos biliares del interior del hígado (conocidos como colangiocarcinomas intrahepáticos) o del interior de los conductos biliares, ya que parten del hígado (conocidos como colangiocarcinomas extrahepáticos). Otros tipos de cánceres raros pueden producirse dentro del hígado. Estos incluyen hemangiosarcomas (tumores malignos llenos de sangre) y hepatoblastomas (un cáncer raro que se desarrolla en los niños muy pequeños).

50 Hay una serie de factores de riesgo asociados con el cáncer de hígado. En Estados Unidos, el factor de riesgo más común para el cáncer de hígado es la cirrosis hepática. La infección crónica con el virus de la hepatitis C (VHC) también es una causa común de cáncer de hígado en Estados Unidos. A nivel mundial, otros factores de riesgo, tales como la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) y la contaminación alimentaria con la aflatoxina B1 son más comunes.

55 Hay varias pruebas de detección que se usan para detectar el cáncer de hígado. Una posible prueba de detección implica la detección de los niveles en sangre de alfa-fetoproteína (AFP). La AFP es una proteína que se encuentra en altos niveles en la sangre fetal, pero normalmente desaparece después del nacimiento. Los niveles de AFP aumentan en presencia del CHC, y pueden ser un marcador del desarrollo del cáncer de hígado. Aunque algunos pacientes que están en alto riesgo de desarrollar cáncer de hígado se someten rutinariamente a ensayos de determinación de los niveles de AFP, no todos los cánceres de hígado producen altos niveles de AFP en sangre, y para el momento en que la mayoría de los pacientes resultan tener niveles elevados de AFP, el tumor ya se encuentra en una fase avanzada. Hay otras proteínas de la sangre que se pueden usar como herramientas de detección del cáncer de hígado. Varios estudios han demostrado que también se pueden usar proteínas tales como la des-gamma-carboxi protrombina (DCP) y la fracción reactiva con la aglutinina *Lens culinaris* (AFP-L3) como marcadores de la formación del cáncer de hígado. Sin embargo, en la práctica, estas se usan con poca frecuencia.

Además, cuando se sospecha de la presencia de cáncer de hígado, se realizan ecografías, tomografías computarizadas, resonancias magnéticas, angiografías, tomografías por emisión de positrones-fluorodesoxiglucosa (FDG-PET), biopsias y laparotomías exploratoria para diagnosticar y determinar la fase del cáncer de hígado.

- 5 La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer de hígado en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tenga cualquiera de los factores de riesgo asociados con el cáncer de hígado, tales como los descritos anteriormente.

(vii) *Cáncer de páncreas*

10 El páncreas es una glándula en forma de pera, de poco más de quince centímetros de longitud, que se encuentra profundamente dentro del abdomen, entre el estómago y la columna vertebral. Se divide en tres partes: la parte más ancha se denomina la cabeza, la sección media es el cuerpo, y el extremo delgado se denomina cola. El páncreas es responsable de fabricar hormonas, incluyendo la insulina, que ayudan a regular los niveles de azúcar en sangre, y enzimas, que son usadas por el intestino para la digestión de los alimentos. Estas enzimas se transportan a través de conductos dentro del páncreas, que se vacían en el conducto biliar común, portando las enzimas al intestino. La incidencia del cáncer de páncreas es más alta entre los 60 y 80 años de edad, y solo se observa rara vez en personas menores de 40 años. Se da casi por igual en varones y en mujeres, aunque las tasas de las mujeres han aumentado en los últimos años, lo que puede deberse a mayores tasas de consumo de tabaco en las mujeres. Los fumadores tienen de dos a tres veces más probabilidades de desarrollar cáncer de páncreas. El riesgo de una persona se triplica si la madre, el padre o los hermanos han tenido la enfermedad. Los antecedentes familiares de cáncer de mama o de colon también aumenta el riesgo. Este aumento del riesgo se debe a mutaciones heredadas en los genes causantes del cáncer. Se desconoce la causa real de esta enfermedad, pero se cree que es el resultado de una combinación de cambios genéticos hereditarios y de cambios causados por la exposición ambiental.

20 Cuando un médico sospecha que un paciente puede tener cáncer de páncreas, se usan la ecografía, tomografía computarizada y endoscopia para diagnosticar la fase del cáncer. Algunos pacientes con cáncer de páncreas pueden tener un nivel elevado de antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9). En los pacientes que tienen un nivel elevado, resulta útil en la confirmación del diagnóstico en combinación con otras pruebas y para monitorizar la enfermedad durante el tratamiento. El nivel se puede comprobar periódicamente durante el tratamiento para ver si el cáncer es estable o ha empeorado.

30 La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer de páncreas en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tenga cualquiera de los factores de riesgo asociados con el cáncer de páncreas, tales como los descritos anteriormente.

(viii) *Cáncer de intestino delgado*

40 El intestino delgado es la parte del tracto digestivo que conecta el estómago y el intestino grueso, también denominado colon. El intestino delgado se divide en tres partes: 1) el duodeno, 2) el yeyuno y 3) el íleon. Sorprendentemente, a pesar de la increíblemente larga longitud del intestino delgado en comparación con el resto del tracto digestivo, el cáncer del intestino delgado es muy raro. Incluye bien los cánceres que comienzan en el intestino o los cánceres que se extienden desde ahí a otro parte del organismo. En concreto, el cáncer de intestino delgado representa menos del 5 % de todos los cánceres intestinales y aproximadamente el 0,5 % de todos los cánceres diagnosticados en EE.UU.

50 Se desconoce la causa de la mayoría de los cánceres del intestino delgado. Hay, sin embargo, algunos posibles factores de riesgo que pueden aumentar la probabilidad de desarrollar cáncer de intestino delgado. Algunos ejemplos incluyen la enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, síndrome de Peutz-Jegher y poliposis intestinal.

Existen cuatro tipos principales de cáncer de intestino delgado, dependiendo del aspecto bajo el microscopio y de la célula de origen. El adenocarcinoma es el tipo más común. Por lo general, se inicia en el revestimiento o en la capa interior del intestino y, normalmente, se produce en el duodeno. Otro tipo es el sarcoma, y el subtipo típico es el leiomiomasarcoma, que comienza en la pared muscular del intestino delgado y, normalmente, se produce en el íleon. El tercer tipo es carcinoide, que comienza en las células productoras de hormonas especiales del intestino delgado y, normalmente, se produce en el íleon, a veces en el apéndice (que es la primera parte del intestino grueso). El cuarto tipo es el linfoma, que comienza en el tejido linfático del intestino delgado y, normalmente, se produce en el yeyuno. El subtipo más típico de linfoma es el linfoma no Hodgkin. Un subtipo poco frecuente de cáncer de intestino delgado es el tumor del estroma gastrointestinal, que puede producirse en cualquiera de las tres partes del intestino delgado.

60 El cáncer del intestino delgado normalmente se diagnostica mediante el historial médico completo, un examen físico y una muestra de heces, endoscopia o colonoscopia, rayos C con bario, tomografía computarizada, ecografía u otras radiografías.

65

La invención es particularmente útil para la prevención del cáncer de intestino delgado en un sujeto, según lo definido en las reivindicaciones, que tenga cualquiera de los factores de riesgo asociados con el cáncer de intestino delgado, tales como los descritos anteriormente.

## 5 V. Prevención

En un aspecto adicional de la divulgación, los presentes inventores han descubierto que los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar para el tratamiento de los cánceres benignos, precancerosos o en fase temprana, o para el tratamiento o la prevención de la reaparición de tumores. Los métodos se pueden usar para tratar el propio cáncer o para prevenir la progresión del cáncer a una fase metastásica o invasiva, o a un grado o a una fase superior. Por ejemplo, los métodos se pueden usar para tratar un sujeto con cáncer en fase 0 o pólipos con el fin de prevenir la progresión a un tumor en fase I o superior. Del mismo modo, en un paciente que tenga cáncer en fase II, los métodos se pueden usar para evitar la progresión del cáncer a un cáncer en fase III o IV.

15 Los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar también para prevenir la reaparición de un tumor. Por ejemplo, si se ha identificado y tratado un tumor (por ejemplo, con quimioterapia o extirpándolo quirúrgicamente), los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar para prevenir la reaparición del tumor colorrectal bien en una zona o la metástasis del tumor colorrectal. Para la prevención de la reaparición del tumor, los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar, por ejemplo, para tratar un tumor latente o micrometástasis, o para prevenir el crecimiento o rebrote de un tumor latente o micrometástasis, que puede ser o no clínicamente detectable.

De acuerdo con la invención, también se ha descubierto que los antagonistas específicos del VEGF se pueden usar para la prevención del cáncer en un sujeto que nunca haya tenido cáncer o que esté en riesgo de desarrollar un cáncer. Hay varios factores de riesgo conocidos por estar asociados con el cáncer, y muchos de ellos se han descrito anteriormente. Los factores de riesgo ilustrativos incluyen la edad avanzada (es decir, por encima de los cincuenta años), un historial familiar de cáncer, infección viral con el VPH, VIH, VHB y VHC, uso de anticonceptivos orales, cirrosis, colitis ulcerosa, esófago de Barrett, infección por *H. pylori* y la presencia de pólipos o displasia. Además, un sujeto que se sepa que tiene un síndrome de cáncer hereditario se considera en riesgo de desarrollar un cáncer. Los ejemplos no limitantes de dichos síndromes incluyen APC HNPCC, el síndrome de Gardner y MEN1. Se pueden determinar otros factores de riesgo para el desarrollo de los cánceres tras una evaluación clínica, e incluyen los niveles altos de hormonas o proteínas de la sangre, tales como PSA (cáncer de próstata), CA-125 (cáncer de ovario), AFP (cáncer de hígado), DCP (cáncer de hígado) y CA 19-9 (cáncer de páncreas).

## 35 VI. Terapia neoadyuvante

La divulgación proporciona un método de terapia neoadyuvante previa a la extirpación quirúrgica del cáncer operable en un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, que comprende administrar al paciente (por ejemplo, cuando el paciente ha sido diagnosticado con un tumor y/o cáncer) una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF. Opcionalmente, el antagonista específico del VEGF se administra en combinación con al menos un agente quimioterapéutico. La etapa adicional de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF después de la cirugía para prevenir la reaparición del cáncer también se puede emplear con las terapias neoadyuvantes descritas en el presente documento. Para los métodos que incluyen la etapa adicional de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF después de la cirugía, se puede usar cualquiera de los métodos adyuvantes descritos en el presente documento.

Por ejemplo, un método incluye tratar el cáncer en un sujeto que comprende las siguientes etapas: a) una primera fase que comprende una pluralidad de ciclos de tratamiento en la que cada ciclo comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab y, opcionalmente, al menos un agente quimioterapéutico a un intervalo predeterminado; b) una cirugía definitiva mediante la que se elimina el cáncer; y, opcionalmente, c) una segunda fase que comprende una pluralidad de ciclos de mantenimiento en la que cada ciclo comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, con o sin cualquier agente quimioterapéutico a un intervalo predeterminado.

Para la terapia neoadyuvante, el antagonista específico del VEGF se puede administrar en una cantidad o durante un tiempo (por ejemplo, para un determinado régimen terapéutico a lo largo del tiempo) para reducir (por ejemplo, un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más) el número de células cancerosas del tumor; para reducir el tamaño del tumor (por ejemplo, para permitir la resección); para reducir la carga tumoral; para inhibir (es decir, para disminuir en cierta medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; para reducir la densidad de los vasos del tumor; para inhibir la metástasis tumoral; para reducir o inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células tumorales; para reducir o prevenir el crecimiento de un tumor latente; para reducir o prevenir el crecimiento o la proliferación de una micrometástasis; para aumentar o prolongar la SLE o la SG de un sujeto susceptible de padecer o de ser diagnosticado con un tumor benigno, precanceroso o no metastásico; y/o para aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

65

En un ejemplo, la terapia neoadyuvante se administra para prolongar la SLE o la SG, en la que la SLE o la SG se evalúan aproximadamente de 2 a 5 años después de una administración inicial del anticuerpo. En ciertas realizaciones, la SLE o la SG del sujeto se evalúan aproximadamente de 3 a 5 años, aproximadamente de 4 a 5 años o al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 5 años después de iniciarse el tratamiento o después del diagnóstico inicial. Por lo general, el antagonista específico del VEGF es un anticuerpo VEGF tal como bevacizumab.

En otro ejemplo, la administración del anticuerpo y/o la quimioterapia puede disminuir la reaparición de la enfermedad (reaparición del cáncer en el órgano primario y/o reaparición distante), en una población de sujetos en aproximadamente un 50 % a los 3 años (donde "aproximadamente un 50 %" en el presente documento, incluye un intervalo del aproximadamente 45 % al aproximadamente 70 %), por ejemplo disminuye la reaparición en el órgano primario en aproximadamente un 52 % a los 3 años y/o disminuye la reaparición distante en aproximadamente un 53 % a los 3 años, en comparación con los sujetos tratados con quimioterapia (por ejemplo, taxoides, tales como paclitaxel) solo.

El antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, se administra a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

Aunque el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, se puede administrar como un solo agente, el paciente se trata, opcionalmente, con una combinación de anticuerpo VEGF, y uno o más agentes quimioterapéuticos. En una realización, al menos uno de los agentes quimioterapéuticos es un taxoide. La administración combinada incluye la coadministración o la administración simultánea, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que, preferentemente, hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen al mismo tiempo sus actividades biológicas. Por lo tanto, el agente quimioterapéutico puede administrarse antes o después de la administración del antagonista específico del VEGF, por ejemplo, anticuerpo VEGF. En esta realización, el tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico y al menos una administración del antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos, y lo más preferentemente, de aproximadamente 2 semanas o menos. Como alternativa, el agente quimioterapéutico y el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF se administran simultáneamente al paciente, en una sola formulación o en formulaciones separadas. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (por ejemplo, taxoide) y el anticuerpo VEGF (por ejemplo, bevacizumab) puede dar lugar a un beneficio sinérgico o un beneficio terapéutico más que aditivo al paciente.

El agente quimioterapéutico, si se administra, normalmente se administra a dosis conocidas para el mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o a los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. Se pueden usar los programas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o de acuerdo con lo determinado empíricamente por el médico experto. Cuando el agente quimioterapéutico es paclitaxel, preferentemente, se administra cada semana (por ejemplo, a 80 mg/m<sup>2</sup>) o cada 3 semanas (por ejemplo, a 175 mg/m<sup>2</sup> o 135 mg/m<sup>2</sup>). Las dosis de docetaxel adecuadas incluyen 60 mg/m<sup>2</sup>, 70 mg/m<sup>2</sup>, 75 mg/m<sup>2</sup>, 100 mg/m<sup>2</sup> (cada 3 semanas); o 35 mg/m<sup>2</sup> o 40 mg/m<sup>2</sup> (cada semana).

Se han desvelado anteriormente varios agentes quimioterapéuticos que se pueden combinar. En ciertas realizaciones de la invención, los agentes quimioterapéuticos que se combinarán con el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, un taxoide (incluyendo docetaxel y paclitaxel), vinca (por ejemplo, vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (tal como carboplatino o cisplatino), inhibidor de la aromatasas (por ejemplo, letrozol, anastrozol o exemestano), antiestrógenos (por ejemplo, fulvestrant o tamoxifeno), etopósido, tiotepa, ciclofosfamida, metotrexato, doxorubicina liposomal, doxorubicina liposomal pegilada, capecitabina, gemcitabina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib) o un inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS342).

Cuando se administra una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina o epirubicina) al sujeto, preferentemente esta se administra antes y/o después de la administración del antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab. Sin embargo, una antraciclina modificada, tal como doxorubicina liposomal (TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX®) o epirubicina, con toxicidad cardiaca reducida, se puede combinar con el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab.

En una realización de un programa de administración, la terapia neoadyuvante comprende una primera etapa en la que un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y uno o más agentes quimioterapéuticos se administran a los pacientes en una pluralidad de ciclos neoadyuvantes, seguida de una cirugía para extirpar definitivamente el tumor. Cada ciclo neoadyuvante consiste en una a tres semanas, dependiendo del plan de tratamiento en particular. Por ejemplo, un ciclo del tratamiento puede ser de tres semanas, lo que significa que los

pacientes reciben una dosis de quimioterapia y una dosis de bevacizumab cada tres semanas. Un ciclo de tratamiento también puede ser de dos semanas, lo que significa que los pacientes reciben una dosis de quimioterapia y una dosis de bevacizumab cada dos semanas. Toda la primera fase del tratamiento neoadyuvante puede durar aproximadamente 4-8 ciclos. En ciertas realizaciones, la terapia neoadyuvante dura menos de un año, en una realización, menos de seis meses antes de la cirugía. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, las dosis preferidas para el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, están en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, lo más preferentemente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, pero sin limitación, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. En algunos aspectos, el régimen quimioterapéutico consiste en la administración intermitente tradicional de dosis altas. En algunos otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran usando dosis más pequeñas y más frecuentes, y sin pausas programadas ("quimioterapia metronómica"). El progreso de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Aparte del anticuerpo VEGF y del agente quimioterapéutico, se pueden combinar otros regímenes terapéuticos con los mismos. Por ejemplo, se puede administrar un segundo (tercer, cuarto, etc.) agente quimioterapéutico, en el que el segundo agente quimioterapéutico es bien otro agente quimioterapéutico taxoide diferente o un agente quimioterapéutico que no es un taxoide. Por ejemplo, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un taxoide (tal como paclitaxel o docetaxel), una vinca (tal como vinorelbina), un compuesto de platino (por ejemplo, cisplatino o carboplatino), un agente antihormonal (tal como un inhibidor de la aromataasa o antiestrógeno), gemcitabina, capecitabina, etc. Los ejemplos de combinaciones incluyen taxoide/compuesto de platino, gemcitabina/taxoide, gemcitabina/vinorelbina, vinorelbina/taxoide, capecitabina/taxoide, etc. Se pueden administrar "cócteles" de diferentes agentes quimioterapéuticos.

Otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el anticuerpo VEGF incluyen uno cualquiera o más de: otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF, tal como un segundo anticuerpo anti-VEGF, variantes de VEGF, fragmentos de receptor de VEGF solubles, aptámeros capaces de bloquear el VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de tirosina quinasas de VEGFR y cualquier combinación de los mismos. Otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral de combinación con el anticuerpo incluyen antagonistas de otros factores que participan en el crecimiento del tumor, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2), ErbB3, ErbB4 o TNF. En una realización ilustrativa, la composición para el antagonista específico del VEGF no incluye un anticuerpo anti-ErbB2, o fragmento o derivado del mismo (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®). En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-VEGF se puede usar en combinación con inhibidores de tirosina quinasas receptoras (RTKI) de bajo peso molecular que se dirigen a una o más tirosina quinasas receptoras tales como los receptores de VEGF, receptores de FGF, receptores de EGF y receptores de PDGF. En la técnica, se conocen muchos RTKI de bajo peso molecular terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEVA®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinib (SUTENT®), semaxanib (SU5416), AMG706, AGO13736, Imatinib (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701, PKC-412, lapatinib (GSK572016), VELCADE®, AZD2171, sorafenib (NEXAVAR®), XL880 y CHIR-265.

Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las que se usan actualmente, y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo VEGF.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a radioterapia.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo VEGF administrado es un anticuerpo intacto, desnudo. Sin embargo, el anticuerpo VEGF puede estar conjugado con un agente citotóxico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo conjugado y/o el antígeno al que está unido es/son interiorizado/s por la célula, generando una mayor eficacia terapéutica del conjugado en la destrucción de la célula cancerosa a la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

## VII. Terapia adyuvante

La divulgación proporciona un método de terapia adyuvante que comprende la administración de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, a un sujeto con cáncer no metastásico, después de la cirugía definitiva.

Por ejemplo, un método puede incluir las siguientes etapas: a) una primera fase que comprende una pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que cada ciclo comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab y, opcionalmente, al menos un agente quimioterapéutico a un intervalo predeterminado; y b) una segunda fase que comprende una pluralidad de ciclos de mantenimiento, en la que cada ciclo comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, sin ningún tipo de agente quimioterapéutico a un intervalo predeterminado; en el que la primera y segunda fase combinadas duran al menos un año después del tratamiento postoperatorio inicial. En una realización, la primera fase comprende una primera pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que se administran un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y un primer régimen quimioterapéutico, seguidos de

una segunda pluralidad de ciclos de tratamiento, en la que se administran un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, y un segundo régimen quimioterapéutico.

5 Para la terapia adyuvante, el antagonista específico del VEGF se puede administrar en una cantidad o durante un tiempo (por ejemplo, para un determinado régimen terapéutico a lo largo del tiempo) para reducir (por ejemplo, un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más) el número de células cancerosas del tumor; para reducir el tamaño del tumor; para reducir la carga tumoral; para inhibir (es decir, para disminuir en cierta medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; para reducir la densidad de los vasos del tumor; para inhibir la metástasis tumoral; para reducir o inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células tumorales; para reducir o prevenir el crecimiento de un tumor latente; para reducir o prevenir el crecimiento o la proliferación de una micrometástasis; para reducir o prevenir el rebrote de un tumor tras el tratamiento o la extirpación; y/o para aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En algunas realizaciones adicionales, el antagonista específico del VEGF se puede usar para prevenir la aparición o reaparición de cáncer en el sujeto. En un ejemplo, la prevención de la reaparición del cáncer se evalúa en una población de sujetos después de aproximadamente cuatro años para confirmar que no se ha producido la reaparición de la enfermedad en al menos aproximadamente el 80 % de la población. En otro ejemplo, la prevención de la reaparición de la enfermedad se evalúa en aproximadamente 3 años, en la que la reaparición de la enfermedad se reduce en al menos aproximadamente el 50 % en comparación con los sujetos tratados solo con quimioterapia.

20 El antagonista específico del VEGF se administra, en general, después de un período de tiempo en el que el sujeto se ha recuperado de la cirugía. Este período de tiempo puede incluir el tiempo necesario para la cicatrización de la herida o la cicatrización de la incisión quirúrgica, el período de tiempo necesario para reducir el riesgo de dehiscencia de la herida o el período de tiempo que el sujeto necesita para volver a un nivel de salud esencialmente similar a o mejor que el nivel de salud previo a la cirugía. El período comprendido entre la finalización de la cirugía definitiva y la primera administración del antagonista específico del VEGF también puede incluir el tiempo necesario para un descanso de los fármacos, en el que el sujeto requiere o solicita un período de tiempo entre los regímenes terapéuticos. En general, el período de tiempo entre la finalización de la cirugía definitiva y el inicio de la terapia con antagonista específico del VEGF puede incluir menos de una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas (28 días), 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años, 3 años o más. En una realización, el período de tiempo entre la cirugía definitiva y la administración del antagonista específico del VEGF es superior a 2 semanas e inferior a 1 año.

35 En un ejemplo, el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, el anticuerpo VEGF, se administra en una cantidad eficaz para prolongar la supervivencia libre de enfermedad (SLE) o la supervivencia global (SG), en la que la SLE o la SG se evalúan aproximadamente de 2 a 5 años después de una administración inicial del anticuerpo. En ciertas realizaciones, la SLE o la SG del sujeto se evalúan aproximadamente de 3 a 5 años, aproximadamente de 4 a 5 años o al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 5 años después de iniciarse el tratamiento o después del diagnóstico inicial.

40 El antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, se administra a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

50 El antagonista específico del VEGF se puede administrar como un solo agente. En otras realizaciones, el paciente se trata con una combinación de antagonista específico del VEGF, y uno o más agentes quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, al menos uno de los agentes quimioterapéuticos es un taxoide. La administración combinada incluye la coadministración o la administración simultánea, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que, opcionalmente, hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen al mismo tiempo sus actividades biológicas. Por lo tanto, el agente quimioterapéutico puede administrarse antes o después de la administración del antagonista específico del VEGF, por ejemplo, de un anticuerpo VEGF. En esta realización, el tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico y al menos una administración del antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, es preferentemente de aproximadamente 1 mes o menos, y lo más preferentemente, de aproximadamente 2 semanas o menos. Como alternativa, el agente quimioterapéutico y el anticuerpo VEGF se administran simultáneamente al paciente, en una sola formulación o en formulaciones separadas. El tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico (por ejemplo, taxoide) y el anticuerpo VEGF (por ejemplo, bevacizumab) puede dar lugar a un beneficio terapéutico sinérgico o más que aditivo al paciente.

65 El agente quimioterapéutico, si se administra, normalmente se administra a dosis conocidas para el mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o a los efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico antimetabolito. Se pueden usar los programas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o de acuerdo con lo determinado empíricamente por el médico experto. Cuando el agente quimioterapéutico es

paclitaxel, preferentemente, se administra cada semana (por ejemplo, a 80 mg/m<sup>2</sup>) o cada 3 semanas (por ejemplo, a 175 mg/m<sup>2</sup> o 135 mg/m<sup>2</sup>). Las dosis de docetaxel adecuadas incluyen 60 mg/m<sup>2</sup>, 70 mg/m<sup>2</sup>, 75 mg/m<sup>2</sup>, 100 mg/m<sup>2</sup> (cada 3 semanas); o 35 mg/m<sup>2</sup> o 40 mg/m<sup>2</sup> (cada semana).

5 Se han desvelado anteriormente varios agentes quimioterapéuticos que se pueden combinar. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos que se combinarán con el anticuerpo VEGF incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, un taxoide (incluyendo docetaxel y paclitaxel), vinca (por ejemplo, vinorelbina o vinblastina), compuesto de platino (tal como carboplatino o cisplatino), inhibidor de la aromatasas (por ejemplo, letrozol, anastrozol o exemestano), antiestrógenos (por ejemplo, fulvestrant o tamoxifeno), etopósido, tiotepa, ciclofosfamida, metotrexato, doxorubicina liposomal, doxorubicina liposomal pegilada, capecitabina, gemcitabina, inhibidor de COX-2 (por ejemplo, celecoxib) o un inhibidor de proteosoma (por ejemplo, PS342).

15 Cuando se administra una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina o epirubicina) al sujeto, preferentemente esta se administra antes y/o después de la administración del anticuerpo VEGF, tal como en los protocolos desvelados en el ejemplo de abajo, en el que se administra una combinación de antraciclina/ciclofosfamida al sujeto después de la cirugía, pero antes de la administración del anticuerpo VEGF y el taxoide. Sin embargo, una antraciclina modificada, tal como doxorubicina liposomal (TLC D-99 (MYOCET®), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX®) o epirubicina, con toxicidad cardiaca reducida, se puede combinar con el anticuerpo VEGF.

20 En un programa de administración, la terapia adyuvante comprende una primera fase en la que un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, y uno o más agentes quimioterapéuticos se administran a los pacientes en una pluralidad de ciclos de tratamiento; y una segunda fase, en la que se usa un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, como agente único en una pluralidad de ciclos de mantenimiento. Cada ciclo de tratamiento consiste en de una a tres semanas, dependiendo del plan de tratamiento en particular. Por ejemplo, un ciclo de tratamiento puede incluir bevacizumab como el antagonista específico del VEGF y puede ser de tres semanas, lo que significa que los pacientes reciben una dosis de quimioterapia y una dosis de bevacizumab cada tres semanas. Un ciclo de tratamiento también puede ser de dos semanas, lo que significa que los pacientes reciben una dosis de quimioterapia y una dosis de bevacizumab cada dos semanas. Toda la primera fase del tratamiento puede durar aproximadamente 4-8 ciclos. Durante la segunda fase de mantenimiento, el bevacizumab se administra bisemanal o trisemanalmente, dependiendo de la duración del ciclo en particular, y durante un total de aproximadamente 30-50 ciclos. En ciertas realizaciones, la terapia adyuvante dura al menos de un año desde el inicio del tratamiento, y se hará un seguimiento del progreso del sujeto tras ese tiempo. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, las dosis preferidas para el anticuerpo VEGF están en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, lo más preferentemente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, pero sin limitación, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. En algunos aspectos, el régimen quimioterapéutico consiste en la administración intermitente tradicional de dosis altas. En algunos otros aspectos, los agentes quimioterapéuticos se administran usando dosis más pequeñas y más frecuentes, y sin pausas programadas ("quimioterapia metronómica"). El progreso de la terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

40 La administración del anticuerpo y la quimioterapia pueden disminuir la probabilidad de reaparición de la enfermedad (reaparición del cáncer en el órgano primario y/o reaparición distante), en una población de sujetos en aproximadamente un 50 % a los 3 años (donde "aproximadamente el 50 %" en el presente documento, incluye un intervalo del aproximadamente 45 % al aproximadamente 70 %), por ejemplo, disminuye la reaparición en el órgano primario en aproximadamente un 52 % a los 3 años y/o disminuye la reaparición distante en aproximadamente un 53 % a los 3 años, en comparación con sujetos tratados con quimioterapia (por ejemplo, taxoide, tal como paclitaxel) solo.

50 La divulgación del presente documento proporciona un método para curar el cáncer no metastásico en una población de sujetos humanos con cáncer no metastásico, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista específico del VEGF, por ejemplo, de un anticuerpo VEGF, y al menos un agente quimioterapéutico a los sujetos después de la cirugía definitiva, y la evaluación de los sujetos después de cuatro o más años para confirmar no se ha producido la reaparición de la enfermedad después de aproximadamente 4 años en al menos aproximadamente el 80 % (preferentemente, al menos aproximadamente el 85 %) de los sujetos. La población puede comprender 3.000 o más sujetos humanos.

60 La divulgación se refiere además a un método para disminuir la probabilidad de reaparición de la enfermedad en una población de sujetos humanos con cáncer no metastásico, que comprende administrar una cantidad eficaz de bevacizumab y al menos un agente quimioterapéutico a los sujetos después de la cirugía definitiva, en el que la probabilidad de reaparición de la enfermedad disminuye en al menos aproximadamente el 50 % a los 3 años en comparación con los sujetos tratados solo con taxoide.

65 Aparte del anticuerpo VEGF y del agente quimioterapéutico, se pueden combinar otros regímenes terapéuticos con los mismos. Por ejemplo, se puede administrar un segundo (tercer, cuarto, etc.) agente quimioterapéutico, en el que el segundo agente quimioterapéutico es bien otro agente quimioterapéutico taxoide diferente o un agente quimioterapéutico que no es un taxoide. Por ejemplo, el segundo agente quimioterapéutico puede ser un taxoide (tal

como paclitaxel o docetaxel), una vinca (tal como vinorelbina), un compuesto de platino (por ejemplo, cisplatino o carboplatino), un agente antihormonal (tal como un inhibidor de la aromataso o antiestrógeno), gemcitabina, capecitabina, etc. Los ejemplos de combinaciones incluyen taxoide/compuesto de platino, gemcitabina/taxoide, gemcitabina/vinorelbina, vinorelbina/taxoide, capecitabina/taxoide, etc. Se pueden administrar "cócteles" de diferentes agentes quimioterapéuticos.

Otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con el anticuerpo VEGF incluyen uno cualquiera o más de: otro antagonista de VEGF o un antagonista del receptor de VEGF, tal como un segundo anticuerpo anti-VEGF, variantes de VEGF, fragmentos de receptor de VEGF solubles, aptámeros capaces de bloquear el VEGF o VEGFR, anticuerpos anti-VEGFR neutralizantes, inhibidores de tirosina quinasas de VEGFR y cualquier combinación de los mismos. Otros agentes terapéuticos útiles para la terapia tumoral de combinación con el anticuerpo incluyen antagonistas de otros factores que participan en el crecimiento del tumor, tales como EGFR, ErbB2 (también conocido como Her2), ErbB3, ErbB4 o TNF. En una realización ilustrativa, la composición para el antagonista específico del VEGF no incluye un anticuerpo anti-ErbB2, o fragmento o derivado del mismo (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF se puede usar en combinación con inhibidores de tirosina quinasas receptoras (RTKI) de bajo peso molecular que se dirigen a una o más tirosina quinasas receptoras tales como los receptores de VEGF, receptores de FGF, receptores de EGF y receptores de PDGF. En la técnica, se conocen muchos RTKI de bajo peso molecular terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, vatalanib (PTK787), erlotinib (TARCEVA®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZD1839, sunitinib (SUTENT®), semaxanib (SU5416), AMG706, AG013736, Imatinib (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701, PKC-412, Lapatinib (GSK572016), VELCADE®, AZD2171, sorafenib (NEXAVAR®), XL880 y CHIR-265.

Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las que se usan actualmente, y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo VEGF.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a radioterapia.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo VEGF administrado es un anticuerpo intacto, desnudo. Sin embargo, el anticuerpo VEGF puede estar conjugado con un agente citotóxico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo conjugado y/o el antígeno al que está unido es/son interiorizado/s por la célula, generando una mayor eficacia terapéutica del conjugado en la destrucción de la célula cancerosa a la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

### VIII. Dosis, formulaciones y duración

La composición de antagonista específico del VEGF se formulará, dosificará y administrará de una manera acorde a la buena práctica médica. Los factores que se han de considerar en este contexto incluyen el trastorno que se esté tratando en particular, el sujeto que se esté tratando en particular, el estado clínico de cada paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del antagonista específico del VEGF que se va a administrar se regirá por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar, o estabilizar, un tumor benigno, precanceroso o en fase temprana; o para tratar o prevenir la aparición o reaparición de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis, por ejemplo, en el entorno neoadyuvante o adyuvante. No es necesario, sino opcional, formular el antagonista específico del VEGF con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el cáncer o un riesgo de desarrollar un cáncer. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista específico del VEGF presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores descritos anteriormente. Estos se usan, en general, a las mismas dosis y con vías de administración usadas anteriormente en el presente documento o aproximadamente con del 1 al 99 % de las dosis empleadas hasta ahora.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo, 0,1 a 20 mg/kg) de antagonista específico del VEGF es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Las dosis particularmente deseables incluyen, por ejemplo, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que el cáncer se trata, medido mediante los métodos descritos anteriormente o conocidos en la técnica. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. En un ejemplo, el anticuerpo de la invención se administra una vez cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas, en un intervalo de dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, incluyendo, pero sin limitación, 7,5 mg/kg o 10 mg/kg. El progreso de la terapia de la invención se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

En un ejemplo, bevacizumab es el antagonista específico del VEGF. Bevacizumab se suministra para usos terapéuticos en viales de un solo uso, sin conservantes, de 100 mg y 400 mg, para administrar 4 ml o 16 ml de bevacizumab (25 mg/ml). El producto de 100 mg se formula en 240 mg de α,α-trehalosa deshidratada, 23,2 mg de

fosfato de sodio (monobásico, monohidrato), 4,8 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 1,6 mg de polisorbato 20 y agua para inyección, USP. El producto de 400 mg se formula en 960 mg de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa deshidratada, 92,8 mg de fosfato de sodio (monobásico, monohidrato), 19,2 mg de fosfato de sodio (dibásico, anhidro), 6,4 mg de polisorbato 20 y agua para inyección, USP.

La duración del tratamiento continuará durante tanto tiempo como esté médicamente indicado o hasta que se obtenga un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, los descritos en el presente documento). En ciertas realizaciones, el tratamiento con antagonistas específicos del VEGF se continúa durante 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, o durante un período de años hasta todo el tiempo de vida del sujeto.

En general, el alivio o el tratamiento de un tumor benigno, precanceroso o en fase temprana, o la terapia adyuvante o neoadyuvante de un cáncer (benigno o maligno) implican la disminución de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con el cáncer. La cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede lograr uno o una combinación de los siguientes para reducir (por ejemplo, un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más) el número de células cancerosas del tumor; para reducir el tamaño del tumor; para reducir la carga tumoral; para inhibir (es decir, para disminuir en cierta medida y/o detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; para reducir la densidad de los vasos del tumor; para inhibir la metástasis tumoral; para reducir o inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células tumorales; para reducir o prevenir el crecimiento de un tumor latente; para reducir o prevenir el crecimiento o la proliferación de una micrometástasis; para reducir o prevenir el rebrote de un tumor después del tratamiento o de la eliminación (por ejemplo, en la terapia adyuvante); para aumentar o prolongar la SLE o la SG de un sujeto susceptible de padecer o diagnosticado con un tumor benigno, precanceroso o no metastásico o un tumor maligno; para reducir el tamaño de un tumor para permitir la cirugía (por ejemplo, en la terapia neoadyuvante); y/o para aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En algunas realizaciones adicionales, el antagonista específico del VEGF se puede usar para prevenir la aparición o reaparición de cáncer en el sujeto. En un ejemplo, la prevención de la reaparición del cáncer se evalúa en una población de sujetos después de aproximadamente cuatro años para confirmar que no se ha producido la reaparición de la enfermedad en al menos aproximadamente el 80 % de la población. En otro ejemplo, la prevención de la reaparición de la enfermedad se evalúa en aproximadamente 3 años, reduciéndose la reaparición de la enfermedad en al menos aproximadamente un 50 % en comparación con los sujetos tratados solo con quimioterapia.

En un ejemplo, el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, un anticuerpo VEGF, se administra en una cantidad eficaz para prolongar la SLE o la SG, evaluándose la SLE o la SG aproximadamente de 2 a 5 años después de una administración inicial del anticuerpo. En ciertas realizaciones, la SLE o la SG del sujeto se evalúa aproximadamente de 3 a 5 años, aproximadamente 4 años o al menos aproximadamente 4 o al menos aproximadamente 5 años después del inicio del tratamiento o después del diagnóstico inicial.

En una realización, la invención se puede usar para aumentar la duración de la supervivencia de un sujeto susceptible de padecer un tumor benigno, precanceroso o no metastásico. La duración de la supervivencia se define como el tiempo desde la primera administración del fármaco hasta la muerte. La duración de la supervivencia también se puede medir mediante la relación de riesgo estratificada (HR) del grupo de tratamiento frente al grupo de control, que representa el riesgo de muerte de un paciente durante el tratamiento.

En otra realización más, el tratamiento de la invención aumenta significativamente la tasa de respuesta en un grupo de sujetos, por ejemplo, de pacientes humanos, susceptibles de padecer un cáncer que se tratan con diversas terapias contra el cáncer. La tasa de respuesta se define como el porcentaje de pacientes tratados que respondieron al tratamiento. En un aspecto, el tratamiento de combinación de la invención usando un antagonista específico del VEGF y cirugía, radioterapia, o uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la tasa de respuesta en el grupo de pacientes tratados en comparación con el grupo tratado con cirugía, radioterapia o quimioterapia solo, teniendo el aumento un valor de p de Chi cuadrado inferior a 0,005.

El tratamiento o la prevención de la aparición o de la reaparición de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis implican la prevención de la formación del tumor o de la metástasis, por lo general, después del tratamiento inicial o de la eliminación de un tumor (por ejemplo, usando una terapia contra el cáncer tal como cirugía, quimioterapia o radioterapia). La cirugía puede dejar atrás células tumorales residuales o nódulos micrometastásicos latentes, que tengan el potencial de reactivar el "programa angiogénico" y de facilitar el crecimiento más exponencial del tumor. Aunque la presencia de un tumor latente o micrometástasis no es necesariamente detectable usando mediciones clínicas o exploraciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella que es suficiente para prevenir o reducir la detección de la reaparición del tumor latente, de la micrometástasis, de la metástasis o del tumor usando técnicas conocidas para el experto. En un ejemplo, un sujeto que se trata de un tumor mediante la extirpación quirúrgica del tumor, se trata luego con un antagonista específico del VEGF y se monitoriza a lo largo del tiempo para detectar la reaparición de un tumor latente, de micrometástasis o del tumor. El antagonista específico del VEGF se puede administrar en combinación con otro tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, antes de, con o después del antagonista específico del VEGF), pudiéndose continuar con una o ambas terapias como tratamiento de mantenimiento.

En la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20050186208, se describen mediciones adicionales de la eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Las formulaciones terapéuticas se preparan usando métodos convencionales conocidos en la técnica mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables ("Remington's Pharmaceutical Sciences" (20ª edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Los vehículos aceptables incluyen solución salina o tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

Opcionalmente, pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, normalmente, por ejemplo, cloruro de sodio, y preferentemente a concentraciones aproximadamente fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la concentración de conservante varía del 0,1 a 2,0 %, normalmente en v/v. Los conservantes adecuados incluyen los conocidos en las técnicas farmacéuticas. El alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno son ejemplos de conservantes. Opcionalmente, las formulaciones pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración del 0,005 al 0,02 %.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación que se esté tratando en concreto, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Lo adecuado es que dichas moléculas estén presentes en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en "Remington's Pharmaceutical Sciences", *supra*.

Se pueden preparar preparados de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico. Mientras que los polímeros tales como el acetato de etilenvinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un largo período de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, generando una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden crear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

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

## IX. Terapias de combinación

La invención también presenta el uso de una combinación de dos o más anticuerpos antagonistas específicos del VEGF de la invención o la combinación de al menos un anticuerpo antagonista específico del VEGF con una o más terapias contra el cáncer. Los ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, cirugía, terapia de radiación (radioterapia), bioterapia, inmunoterapia, quimioterapia o una combinación de estas terapias. Además, se pueden usar agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos y antiproliferativos en combinación con el antagonista

específico del VEGF.

En un ejemplo, la invención presenta el uso de un anticuerpo antagonista específico del VEGF con uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, un cóctel). Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen irinotecán, fluorouracilo, leucovorina o cualquier combinación de los mismos. La administración combinada incluye la administración simultánea, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen al mismo tiempo sus actividades biológicas. Se pueden usar programas de preparación y de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determinado empíricamente por el médico experto. También se describen programas de preparación y de dosificación para la 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 del VEGF o se puede administrar de forma simultánea con el mismo.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación que se esté tratando en particular, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos que se unen a EGFR, VEGF (por ejemplo, un anticuerpo que se una a un epítipo diferente en VEGF), VEGFR o ErbB2 (por ejemplo, Herceptin®) en la formulación. En una realización ilustrativa, la composición para el antagonista específico del VEGF no incluye un anticuerpo anti-ErbB2, o fragmento o derivado del mismo, (por ejemplo, el anticuerpo Herceptin®). Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o un antagonista de VEGFR de bajo peso molecular. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

Para la prevención de la enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo antagonista específico del VEGF dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta al antagonista específico del VEGF, así como del criterio del médico tratante. El anticuerpo antagonista específico del VEGF se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. En un régimen de terapia de combinación, el anticuerpo antagonista específico del VEGF y el uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. Como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella que la administración conjunta de un anticuerpo antagonista específico del VEGF y uno o más de otros agentes terapéuticos, o la administración de una composición de la invención, produce la reducción o la inhibición del cáncer como se ha descrito anteriormente. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad de un anticuerpo antagonista específico del VEGF y uno o más otros agentes terapéuticos necesarios para reducir o eliminar sinérgica o significativamente las afecciones o los síntomas asociados con una determinada enfermedad.

El anticuerpo antagonista específico del VEGF y el uno o más de otros agentes terapéuticos se pueden administrar simultánea o secuencialmente en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir o eliminar la aparición de un tumor, un tumor latente o una micrometástasis.

Anticuerpo

El antagonista específico del VEGF se puede envasar solo o en combinación con otros compuestos terapéuticos contra el cáncer como un kit. El kit puede incluir componentes opcionales que ayuden en la administración de la dosis unitaria a pacientes, tales como viales para la reconstitución de formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV a medida, inhaladores, etc. Además, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación y la administración de las composiciones. El kit se puede fabricar como una dosis unitaria de un solo uso para un paciente, múltiples usos para un paciente en particular (a una dosis constante o en las que los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que avanza el tratamiento); o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("envase a granel"). Los componentes del kit pueden estar montados en cajas de cartón, envases de ampollas, frascos, tubos y similares.

#### X. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se desvela un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente, una etiqueta y un prospecto. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti-VEGF. La etiqueta del, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente 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 un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. Además, el artículo de fabricación comprende un prospecto con instrucciones de uso, incluyendo, por ejemplo, un aviso de que la composición no es para su uso en combinación con otra composición, o instruir al usuario de la composición sobre la administración de la composición de anticuerpo anti-VEGF solo o en combinación con una composición contra el cáncer a un paciente. La expresión "instrucciones de uso" significa proporcionar indicaciones para la terapia aplicable, la medicación, el tratamiento, los regímenes de tratamiento y similares, por cualquier medio, por ejemplo, por escrito, tal como en forma de prospectos o cualquier otro material promocional por escrito.

## 10 X. Depósito de materiales

La siguiente línea celular de hibridoma se ha depositado en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest con la colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas, VA, EE.UU.

## 15 N.º ATCC de designación del anticuerpo

### Fecha del depósito

A4.6.1 ATCC HB-10709, 29 de marzo de 1991.

## 20 Ejemplos

### Referencia

## 25 Ejemplo 1. La inhibición de VEGF-A produce la detención del crecimiento de adenomas intestinales y la supervivencia a largo plazo de ratones $Apc^{min/+}$

El síndrome de poliposis adenomatosa familiar (PAF) y la mayoría de los cánceres colorrectales esporádicos están causados por mutaciones en el gen APC. Los pacientes con PAF desarrollan de cientos a miles de pólipos adenomatosos en el tracto gastrointestinal (GI) inferior, además de tumores extracolónicos, que incluyen tumores desmoides y tumores en el tracto gastrointestinal superior. Los ratones  $Apc^{min/+}$  con un alelo de truncamiento heterocigótico en el codón 850 imitan algunas características de la poliposis de los pacientes con PAF con la mutación de la línea germinal APC (Moser *et al.*, *Science* 247:322-324 (1990), Su *et al.*, *Science* 256:668-670 (1992)). El inicio de la formación de tumores en los ratones  $Apc^{min/+}$  se produce en la edad adulta temprana, y los animales normalmente desarrollan de 60 a 150 pólipos intestinales en un fondo genético C57BL/6. El desarrollo de los tumores compromete gravemente la longevidad de los ratones, provocando, en general, la muerte por anemia y/o hipoproteinemia (Moser *et al.*, *Science* 247:322-324 (1990)) en torno a la edad de cinco meses. Mientras que los seres humanos con PAF suelen desarrollar adenomas de colon, los ratones  $Apc^{min/+}$ , por razones que no se comprenden del todo, desarrollan la gran mayoría de los pólipos en el intestino delgado. Estos pólipos alcanzan un tamaño de 1-2 mm de diámetro, mientras que los pólipos de mayor tamaño (de hasta 4 mm de diámetro) se presentan con una frecuencia inferior. Solo se observan ocasionales adenomas de colon, comúnmente de 0 a 3 por animal.

Se ha informado que Apc participa en los procesos celulares incluyendo la proliferación, la apoptosis, la migración celular, la adhesión celular, el ensamblaje de los microtúbulos, la transducción de señales y la segregación de cromosomas (revisado en Nathke, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20:337-366 (2004)). La función mejor estudiada de Apc es su papel como regulador de la beta-catenina en la vía de señalización de Wnt (revisado en Nathke, *Mol. Pathol.* 52:169-173 (1999)). En resumen, en ausencia de la señalización de Wnt, Apc se une a la axina y a GSK-3beta quinasa para formar un complejo de destrucción para la beta-catenina citoplásmica, lo que impide su translocación nuclear y la posterior activación de la familia de factores de transcripción del factor de linfocitos T/factor potenciador linfoide (TCF/LEF). Las dianas transcripcionales de TCF/LEF incluyen moléculas implicadas en las vías celulares mencionadas anteriormente.

La investigación de los mecanismos del crecimiento tumoral en xenoinjertos tiene algunas limitaciones, ya que estos modelos no recapitulan el desarrollo de los tumores en un entorno natural. Para examinar los efectos de la terapia antiangiogénica en un modelo de tumor no maligno de predisposición genética, de origen natural, se ha estudiado el modelo  $Apc^{min/+}$  de adenomatosis intestinal. En el siguiente ejemplo, se analizó el fenotipo tumoral de los ratones  $Apc^{min/+}$  después del tratamiento a corto y a largo plazo con el antagonista específico del VEGF a modo de ejemplo, mAb anti-VEGF-A, así como después de una delección genética de VEGF-A mediante la tecnología de Cre-LoxP en las células epiteliales intestinales.

Para los experimentos descritos a continuación, se obtuvieron ratones  $Apc^{min/+}$  (número de reserva 002020, 5) y ratones 12.KbVilCre (número de reserva 004586, de aquí en adelante, VillinCre, Madison *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:33275-33283 (2002)) del laboratorio Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones VEGF<sup>lox/lox</sup> (de aquí en adelante, VEGF<sup>lox</sup>) se han publicado previamente (Gerber *et al.*, "Development" 126:1149-1159 (1999)). Se alojaron los animales en jaulas de microaislamiento en una instalación de barrera y es alimentaron a voluntad. El

mantenimiento de los animales y los protocolos experimentales se realizaron siguiendo las regulaciones federales y aprobadas por el comité institucional de cuidado y uso de animales.

#### Expresión de VEGF-A en adenomas intestinales *Apc*<sup>min/+</sup>

Para investigar el patrón de expresión de VEGF-A en los tumores intestinales de ratones *Apc*<sup>min/+</sup>, se realizó la hibridación *in situ* en adenomas de ratones de 14 semanas. Para estos experimentos, la hibridación *in situ* se realizó como se ha descrito previamente (Ferrara *et al.*, *Am. J. Pathol.* 162:1881-1893 (2003)). En resumen, se desparafinaron cortes de tejido intestinal embebidos en parafina, deshidratados y fijados en formalina tamponada neutra, y se hidrataron antes de la desproteinización en 20 µg/ml de proteinasa K durante 15 minutos a 37 °C. Se hibridaron ribosondas sentido y antisentido marcadas con [<sup>33</sup>P]UTP a 55 °C durante la noche, seguido de un lavado de alta rigurosidad en 55 °C en 0,1 x citrato en solución salina convencional durante 2 horas. Se expusieron los portaobjetos de vidrio secos durante 3 días a temperatura ambiente a una película autorradiográfica Kodak BioMax MR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY), seguido de la inmersión en emulsión de pista nuclear NTB2 (Eastman Kodak Co.), la exposición de las cajas de portaobjetos de plástico selladas que contenían desecante durante 28 días a 4 °C, el revelado y la contraincubación con H&E (hematoxilina-eosina). La sonda de VEGF-A se preparó como se ha descrito previamente (Ferrara *et al.*, *Am. J. Pathol.* 162:1881-1893 (2003)). La longitud de la sonda de VEGF-A era de 349 nucleótidos correspondientes a los nucleótidos 297-645 de NM\_031836. La secuencia del cebador superior fue 5'-CAA CGT CAC TAT GCA GAT CAT GCG (SEQ ID NO: 1); y la secuencia del cebador inferior fue 5'-GGT CTA GTT CCC GAA ACC CTG AG (SEQ ID NO: 2).

En estos experimentos de hibridación *in situ*, se observó la expresión de VEGF-A en las células epiteliales con intensidad variable en comparación con el epitelio normal de las vellosidades intestinales, mientras que se observó una señal focalmente destacada en las células del estroma de los adenomas, así como en el estroma de la vellosidades normalidad (Fig. 1A-F).

#### La inhibición de VEGF-A reduce la carga tumoral de ratones *Apc*<sup>min/+</sup>

Para determinar si la terapia con anti-VEGF-A sería eficaz en la reducción de la carga tumoral de los tumores intestinales benignos en el ratón, se trataron ratones *Apc*<sup>min/+</sup> con el mAb anti-VEGF-A G6-31 en un formato quimérico de ratón-ser humano, para reducir la posibilidad de provocar una respuesta inmune. El mAb anti-VEGF-A G6-31 se obtuvo de bibliotecas de fagos de Fab humanos como se describe (Liang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:951-961 (2006)). Para generar un anticuerpo adecuado para la administración a largo plazo en ratones, se injertaron los dominios variables en el dominio constante de IgG2a murina. Se administraron mAb G6-31 (Liang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:951-961 (2006)) o IgG2a murina de control del mismo isotipo (anti-GP120), ambos a la dosis de 5 mg/kg, por vía intraperitoneal una vez a la semana en un volumen de 90 a 140 µl en PBS. Los tratamientos se continuaron durante 3 semanas, 6 semanas, hasta un año o hasta que los ratones se encontraron moribundos. El tratamiento de 5 a 14 ratones por cada grupo se inició a los 91 ± 3 días de edad.

Se seleccionó el mAb G6-31 debido a su capacidad para bloquear de forma potente el VEGF-A tanto de ratón como de ser humano (Liang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:951-961 (2006)). Esto se diferencia del mAb anti-VEGF bien diferenciado A.4.6.1, que inhibe el VEGF-A humano, pero no de ratón (Gerber *et al.*, *Cancer Res.* 60:6253-6258 (2000), Liang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:951-961 (2006)). Para evaluar el efecto a corto plazo del mAb G6-31 en la carga tumoral, se inició el tratamiento de diez ratones por cohorte a las trece semanas de vida, y se continuó durante 3 o 6 semanas. Para determinar el fenotipo de los tumores a la edad de inicio del tratamiento, se analizó un grupo de control no tratado de doce ratones a las trece semanas de vida (día 0).

El tratamiento con mAb anti-VEGF-A, ya sea durante 3 o 6 semanas redujo significativamente la carga tumoral global en los ratones *Apc*<sup>min/+</sup>. En el día 0, la carga tumoral media de los ratones *Apc*<sup>min/+</sup> era de 39,3 mm<sup>3</sup> (variando de 12,3 mm<sup>3</sup> a 97,0 mm<sup>3</sup>) (Fig. 2A). La carga tumoral media de los ratones tratados con IgG de control durante tres semanas era de 96,8 mm<sup>3</sup> (47,1-299,9 mm<sup>3</sup>), mientras que la carga tumoral media de los ratones tratados durante 3 semanas con mAb G6-31 era de 23,5 mm<sup>3</sup> (4,5 -58,2 mm<sup>3</sup>). Esta fue una reducción estadísticamente significativa del 76 % de, o de 4 veces, de la carga tumoral media tras el tratamiento con el mAb G6-31, con un p < 0,008. Tras seis semanas de la administración con IgG de control, la carga tumoral alcanzó una media de 198,6 mm<sup>3</sup> (40,5-315,7 mm<sup>3</sup>), mientras que la carga tumoral en los ratones tratados con mAb G6-31 se mantuvo baja, a 28,4 mm<sup>3</sup> (3,2-75,9 mm<sup>3</sup>), presentando una reducción significativa del 86 %, o de 7 veces, en la carga tumoral media con un valor de p < 5,3 x 10<sup>-5</sup> (Fig. 2A).

La notable reducción de la carga tumoral tras tres y seis semanas de tratamiento con mAb G6-31 se debió a una reducción del tamaño de los adenomas, en oposición a una disminución del número de adenomas. Después de tres semanas de tratamiento con IgG de control, el número medio de tumores resultó ser de 116 ± 9 (± ETM), mientras que después de la administración del mAb G6-31, el número medio de tumores resultó ser de 107 ± 11 (p < 0,28). Después de seis semanas de tratamiento con IgG de control, el número medio de tumores resultó ser de 120 ± 11, mientras que después de la administración del mAb G6-31 resultó ser de 100 ± 10 (p < 0,09). El día 0, los ratones tenían una media de 100 ± 9 tumores.

Para el análisis del tamaño y del número de los tumores, se abrió longitudinalmente el tracto intestinal desde el estómago glandular hasta el recto, se lavó y se extendió sobre una superficie de papel de filtro. Después de la fijación durante la noche con fijador Notox Histo (Scientific Design Laboratory Inc., Des Plaines, IL) y la tinción con una solución acuosa de azul de metileno al 0,1 %, un observador individual, cegado al tratamiento, clasificó el número, la ubicación y el diámetro de cada adenoma intestinal del intestino delgado y grueso en una escala ocular a una ampliación de 20 aumentos en un microscopio de disección Leica. Mediante este método, se registraron de forma fiable los pólipos con un diámetro de 0,3 mm o superior. Los volúmenes tumorales se calcularon como hemisferios. La carga tumoral para cada ratón se calculó como la suma de sus volúmenes tumorales. Los valores de  $p$  se han calculado con la prueba  $t$  de Student de dos colas. Se analizó un grupo no tratado de ratones (día 0) a la edad de inicio del tratamiento (13 semanas) como control para los ratones tratados con anticuerpos.

No hubo pruebas de que el crecimiento de los adenomas se escapara del tratamiento con anti-VEGF-A durante 3 o 6 semanas de tratamiento: los tumores de los ratones tratados con mAb G6-31 resultaron tener una distribución de tamaño más compacta (Fig. 2B, gráfica media e inferior) en comparación con la distribución de tamaños más amplia de los tumores de los ratones tratados con IgG de control (Fig. 2B, gráficas segunda y cuarta de la parte superior). El diámetro medio de los pólipos de los ratones que recibieron durante tres semanas IgG de control fue de 1,28 mm, y mAb G6-31, de 0,85 mm ( $p < 9,2 \times 10^{-117}$ ), mientras que el diámetro medio de los pólipos de los ratones que recibieron durante seis semanas la IgG de control fue de 1,64 mm, y mAb G6-31, de 0,86 mm ( $p < 2,7 \times 10^{-214}$ ). El diámetro medio de los tumores el día 0 fue de 0,97 mm.

Curiosamente, el tratamiento con anti-VEGF-A pareció inhibir el crecimiento de los tumores de todos los tamaños. Después de un tratamiento de 3 semana con mAb G6-31, la frecuencia de los tumores pequeños, de 0,3 a 1,0 mm de diámetro (para el tratamiento de 6 semanas, de 0,3 a 1,2 mm) fue mayor que en el grupo tratado con control, mientras que la frecuencia de los tumores con diámetro superior a 1,0 mm (durante 6 semanas  $> 1,2$  mm) se redujo (Fig. 2C, gráfica superior y media). Una comparación de la distribución de los tamaños tumorales el día 0 (Fig. 2C, gráfica inferior) sugirió que el crecimiento de los adenomas se había detenido esencialmente tras iniciarse la administración de mAb G6-31.

Por otra parte, el mAb anti-VEGF-A G6-31 fue eficaz en suprimir el crecimiento de los adenomas en todas las zonas del intestino delgado. Se observó un diámetro medio del tumor significativamente inferior después del tratamiento con mAb G6-31 en comparación con el tratamiento con IgG de control tras tres y seis semanas de tratamiento (Fig. 2D). Además, el diámetro medio de los adenomas en el primer cuarto intestinal de los ratones tratados con mAb G6-31 se redujo significativamente con respecto al observado en los ratones el día 0 (doble asterisco en la Fig. 2D). La reducción del diámetro medio tumoral de los adenomas de colon no alcanzó significación estadística (Fig. 2D). El diámetro medio de los pólipos del intestino grueso en ratones tratados con mAb G6-31 durante tres semanas fue de  $1,3 \pm 0,3$  mm ( $\pm$  ETM), mientras que el diámetro medio en los ratones tratados con IgG de control fue de  $2,5 \pm 0,4$  mm, con un valor de  $p < 0,064$ . El diámetro medio de los tumores del intestino grueso después de seis semanas de tratamiento con mAb G6-31 fue de  $2,2 \pm 0,3$  mm y de  $2,6 \pm 0,3$  mm tras la administración con IgG de control, con un valor de  $p < 0,37$ .

#### La eliminación de VEGF-A en células epiteliales intestinales reduce el diámetro medio tumoral

A continuación, se intentó analizar la contribución de VEGF-A de origen epitelial intestinal en el desarrollo de adenomas en el modelo  $Apc^{min/+}$ . Con este fin, se evaluaron el diámetro y el número de los tumores, como se ha descrito anteriormente, en ratones  $Apc^{min/+}$  de 13 semanas de edad, que se cruzaron con ratones en los que VEGF-A se había suprimido condicionalmente en las células epiteliales intestinales con la tecnología Cre/loxP (VEGF<sup>lox</sup>; ratones Villin-Cre). Se analizaron ratones  $Apc^{min/+}$ ; Villin-Cre y  $Apc^{min/+}$ ; VEGF<sup>lox</sup>; Villin-Cre a las trece semanas de vida.

La expresión de Villin, una proteína de unión a la actina y un componente estructural importante del borde en cepillo de las células absorbentes especializadas, comienza durante la embriogénesis en el endodermo del intestino posterior, y más tarde se extiende a lo largo del endodermo del intestino delgado y grueso (Braunstein *et al.*, *Dev. Dyn.* 224:90-102 (2002), Ezzell *et al.*, *Development* 106:407-419 (1989), Maunoury *et al.*, *EMBO J.* 7:3321-3329 (1988), y Maunoury *et al.*, *Development* 115:717-728 (1992)). En el adulto, la distribución de Villin se vuelve difusa con polarización apical moderada en las células proliferativas inmaduras de las criptas, y potente polarización en los bordes en cepillo de las células completamente diferenciadas que recubren las vellosidades del intestino delgado (Robine *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:8488-8492 (1985)). La expresión de la recombinasa Cre impulsada por el promotor Villin (Villin-Cre) se ha caracterizado previamente recapitulando el patrón expresión del gen Villin en cada célula del epitelio intestinal desde la cripta a la punta de las vellosidades y el duodeno a través de colon (Madison *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:33275-33283 (2002)).

El análisis fenotípico reveló que el diámetro tumoral medio de ratones  $Apc^{min/+}$ ; Villin-Cre de control fue de  $1,02 \pm 0,3$  mm ( $\pm$  ETM), mientras que el diámetro tumoral medio de ratones  $Apc^{min/+}$ ; VEGF<sup>lox</sup>; Villin-Cre fue de  $0,82 \pm 0,3$  mm (Fig. 2E), lo que demuestra una reducción del 19,8 % ( $p < 7,2 \times 10^{-5}$ ). El número de tumores no fue significativamente diferente entre los dos grupos. Mientras que los ratones  $Apc^{min/+}$ ; Villin-Cre tenían  $137 \pm 11$  adenomas intestinales, los ratones  $Apc^{min/+}$ ; VEGF<sup>lox</sup>; Villin-Cre tenían  $150 \pm 17$  adenomas ( $p < 0,27$ ).

Estos datos indican que la supresión de VEGF-A de todas las células epiteliales intestinales desde el duodeno al colon, y la cripta a la punta de las vellosidades produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral, aunque de un grado reducido en comparación con la que resulta de la administración sistémica de anticuerpo anti-VEGF. Por lo tanto, estos datos sugieren que las fuentes extra-epiteliales de VEGF-A contribuyen al crecimiento de los adenomas intestinales de ratones *Apc<sup>min/+</sup>*.

**La inhibición de VEGF-A prolonga la supervivencia media de los ratones *Apc<sup>min/+</sup>***

Dada la eficacia del tratamiento con anti-VEGF-A en la inhibición del crecimiento tumoral, los presentes inventores quisieron investigar si el tratamiento con mAb G6-31 podría producir beneficios a largo plazo para los ratones *Apc<sup>min/+</sup>*. Con este fin, se continuó la administración con mAb G6-31 o IgG de control hasta 52 semanas o hasta que se observó que los ratones estaban moribundos. Curiosamente, el tratamiento con mAb G6-31 aumentó la supervivencia media de 24,0 semanas con IgG de control a 33,6 semanas con mAb G6-31 con valor de p en rango logarítmico < 2,4 x 10<sup>-3</sup> (Fig. 2F).

Se analizó el fenotipo tumoral de cuatro ratones tratados con mAb G6-31 tras practicarles la eutanasia a las 32, 51, 64 o 66 semanas de vida (tras 19, 38, 51 o 53 semanas de tratamiento con mAb G6-31, respectivamente). Como se muestra en la Tabla 1, el diámetro tumoral medio se mantuvo en un nivel cercano al observado en ratones de diecinueve semanas de vida (1,64 mm en los ratones tratados con IgG de control durante seis semanas). Del mismo modo, el número de tumores permaneció comparable al de los ratones de trece semanas de vida (los ratones del grupo del día 0 tenían de 59 a 161 adenomas intestinales con una media de 100). Tres (uno de cada ratón 2, 3 y 4 de la Tabla 1) de los quince adenomas de colon (número total identificado en los ratones 1-4) que fueron capturados en el plano de sección en el análisis histológico no mostraron ninguna transformación maligna.

**Tabla 1. Datos tumorales de los ratones en el tratamiento con G6-31 prolongado**

ratón	edad (semanas)	semanas con G6-31	n.º de tumores	diámetro medio tumoral (mm)	carga tumoral (mm <sup>3</sup> )
1	32	19	55	0,65	6,3
2	51	38	133	1,72	263,5
3*	64	51	85	2,21	341,1
4*	66	53	150	1,63	282,2

\*animal sano sacrificado en el punto final del estudio

En resumen, el tratamiento con anti-VEGF-A a largo plazo, en general, fue bien tolerado y produjo un aumento de la supervivencia de los ratones *Apc<sup>min/+</sup>*. Por otra parte, el número de tumores y el diámetro tumoral medio en los ratones tratados con mAb G6-31 a largo plazo permaneció sorprendentemente bajo en vista de la edad de los ratones, en consonancia con una inhibición de la formación de nuevos adenomas y el crecimiento de adenomas.

**Niveles totales de proteína, albúmina y triglicéridos en suero normales y reducción de la hematopoyesis extramedular esplénica en ratones *Apc<sup>min/+</sup>* tratados con anticuerpos anti-VEGF-A**

Como observación general, los ratones *Apc<sup>min/+</sup>* tratados con mAb G6-31 parecieron considerablemente más alerta y receptivos que los ratones tratados con IgG de control. Por otro lado, se observaron patas pálidas, que sugieren anemia progresiva inicialmente informada por Moser *et al.* (Moser *et al.*, *Science* 247:322-324 (1990)), regularmente en los animales tratados con IgG de control, pero no en los animales tratados con mAb G6-31. En línea con esta observación, la proteína total y la albúmina medias en suero se redujo en los ratones *Apc<sup>min/+</sup>* que recibieron IgG de control, mientras que los niveles de proteína total y de albúmina resultaron estar dentro del intervalo normal en los ratones tratados con mAb G6-31 (Tabla 2).

**Tabla 2. Química del suero.**

grupo	proteína total (g/dl)*	Albúmina (g/dl)**	Triglicéridos (mg/dl)***
IgG de control, 3 semanas (n = 10)	3,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1	268,9 ± 82,5
G6-31, 3 semanas (n = 10)	4,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	75,5 ± 4,9
IgG de control, 6 semanas (n = 10)	3,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2	591,1 ± 81,3
G6-31, 6 semanas (n = 10)	4,9 ± 0,1	2,7 ± 0,1	71,1 ± 4,3

\*valor de referencia de 3,9-5,5 g/dl

\*\*valor de referencia de 2,3-3,2 g/dl

\*\*\*valor de referencia de 35-244 mg/dl

± Error típico de la media (ETM)

Como se informó para los ratones *Apc<sup>min/+</sup>* (Moser *et al.*, *Science* 247:322-324 (1990)), y en consonancia con la hipoproteinemia, el nivel medio de triglicéridos fue elevado en los animales tratados con IgG de control, a pesar de

que se redujo hasta una nivel comparable con el valor de referencia tras el tratamiento con mAb G6-31 (Tabla 2).

Si bien no hubo diferencias relacionadas con el tratamiento en las masas corporales después de tres o seis semanas de tratamiento, las masas medias del bazo aumentaron significativamente ( $p < 2,3 \times 10^{-3}$ ) en los ratones tratados con IgG de control. Después de tres semanas de la administración de IgG de control, los ratones resultaron tener una masa media del bazo de 0,26 g, o del 1,17 % de la masa corporal, mientras que la masa media del bazo resultó ser de 0,11 g (0,49 % de la masa corporal) en los ratones tratados con mAb G6-31 durante tres semanas. El aumento de la masa media del bazo en los ratones tratados con IgG de control coincide con la hematopoyesis extramedular (EMH, eritropoyesis compensatoria, en este caso secundaria a la hemorragia intestinal), que se confirmó mediante el examen histológico de los bazos. Diez de los diez ratones tratados durante 6 semanas con IgG de control mostraron una notable EMH, mientras que dos ratones tratados con mAb G6-31 resultaron tener EMH moderada, cinco resultaron tener EMH leve y tres de ellos no tuvieron ningún cambio de diagnóstico en el bazo. Cuatro de los cinco ratones tratados con mAb G6-31 durante 18-53 semanas fueron diagnosticados con EMH leve a extensa en el bazo.

El menor grado de EMH en el bazo de los ratones tratados con mAb G6-31 a corto plazo sugiere que la terapia con anti-VEGF-A tiene un efecto beneficioso en la reducción del sangrado intestinal.

### **Cambios renales tras el tratamiento a largo plazo con mAb G6-31**

Para investigar la posible toxicidad relacionada con la administración de mAb anti-VEGF-A G6-31 de alta afinidad, se analizaron histológicamente el páncreas, el hígado y los riñones tras el tratamiento a corto plazo (3-6 semanas) y a largo plazo (18-53 semanas). Para el análisis histológico, se deshidrató tejido intestinal fijado con Notox y se introdujo en parafina, se cortó y se tiñó con H&E para realizar el análisis histológico siguiendo protocolos convencionales.

No se observó una toxicidad significativa en los animales tratados durante 3-6 semanas. Después del tratamiento a largo plazo con mAb G6-31, cinco de los cinco ratones mostraron glomeruloesclerosis global difusa variable (de leve a grave) y edema estromal moderado del páncreas (lo que reflejaba hipoproteinemia). Estas observaciones coinciden con la toxicidad observada anteriormente como resultado de la administración a largo plazo de mAb G6-31. Es importante destacar que los efectos adversos fueron compensados por la mejora general de la salud reflejada en el aumento de la mediana de la supervivencia.

### **La alteración de la morfología tumoral tras el tratamiento con mAb G6-31 no se vio acompañada de un cambio en el índice de proliferación**

Para caracterizar adicionalmente los pólipos intestinales en ratones *Apc<sup>min/+</sup>* después del tratamiento con mAb anti-VEGF-A G6-31, se realizaron análisis macroscópicos e histológicos como se ha descrito anteriormente. La morfología macroscópica de los pólipos tratados con mAb G6-31 resultó diferir notablemente de la de los pólipos tratados con la IgG de control (Fig. 3A-B). Mientras que los tumores de los ratones que habían recibido IgG de control resultaron tener, en general, una superficie relativamente uniforme, lisa, los tumores de los animales tratados con mAb G6-31 resultaron tener invaginaciones profundas en su superficie. El análisis histológico reveló que los tumores de los ratones tratados con mAb G6-31 e IgG de control eran adenomas tubulares (Fig. 3C-F). Los adenomas de los ratones tratados con IgG de control resultaron tener una notable proliferación epitelial entre las vellosidades, con expansión vertical y lateral, y, por lo general, se ampliaron más del doble desde su base hasta la superficie luminal. Había estroma fibroso mínimo. Los adenomas de los ratones tratados con mAb G6-31 resultaron tener característicamente menos células epiteliales entre las vellosidades, resultaron ser menos anchos en la superficie luminal, más superficiales y abarcaron menos vellosidades adyacentes. El análisis histológico de los pólipos de colon en ambos grupos de tratamiento mostró adenomas tubulares pedunculados con abundante estroma fibrovascular y una cantidad variable (hasta 100 %) del epitelio displásico.

Para evaluar el grado de proliferación en el tejido tumoral y en la mucosa normal, se realizó una tinción inmunohistoquímica indirecta con anticuerpo Ki-67 (Fig. 3G-J). Para estos experimentos, se desparafinaron cortes de tejido intestinal introducidos en parafina, deshidratados y fijados con Notox, y se hidrataron antes de la incubación en Target Retrieval (DAKO, Glostrup, Dinamarca) a 99 °C seguida de la inactivación de la actividad de la peroxidasa endógena y el bloqueo de la avidina y la biotina (Vector, Burlingame, CA). Se bloquearon los cortes adicionalmente durante 30 minutos con suero de bloqueo al 10 % en PBS con albúmina de suero bovino al 3 %. Se incubaron los cortes de tejido con anticuerpos primarios diluidos en el suero de bloqueo durante 60 minutos, se lavaron con tampón de TBST (DAKO) y se incubaron con anticuerpos secundarios durante 30 minutos, se lavaron con TBST y se incubaron en reactivo ABC Elite (Vector) durante 30 minutos seguido de una incubación en Metal Enhanced DAB (Pierce, Rockford, IL) y la contratinción con hematoxilina de Mayer. El anticuerpo primario usado fue anticuerpo policlonal de conejo contra Ki-67 (SP6, 1:200, Lab Vision, Fremont, CA). El anticuerpo secundario usado fue anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo (7,5 µg/ml, Vector). Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente.

El análisis cuantitativo reveló cantidades similares de células positivas en Ki-67 en los tumores de los ratones tratados bien con IgG de control o con mAb G6-31. Del mismo modo, el índice de proliferación de la mucosa adyacente normal fue comparable entre ambos tratamientos (Fig. 3K). El índice de proliferación se cuantificó a partir de imágenes de cortes de 5  $\mu\text{m}$  de tejido tumoral y mucosa normal en parafina adquiridos con un sistema de microscopio de barrido de portaobjetos Ariol SL50 (Applied Imaging, Inc., San Jose, CA) utilizando el ensayo de Kisight (Ariol Review (v2.6)). Se identificaron de forma manual las regiones de tejido tumoral y de mucosa normal, y se rodearon por parte de un examinador con ocultación. Se cuantificó el índice de proliferación, medido como el porcentaje de núcleos positivos en Ki-67 en relación con los núcleos totales, de una manera semiautomatizada basada en el color de los núcleos siguiendo la definición de un umbral positivo. Las mediciones del índice de proliferación incluyeron el análisis de 29 tumores del grupo de tratamiento con mAb G6-31 ( $n = 3$ ) y 44 tumores del grupo de IgG de control ( $n = 3$ ), todos tratados durante seis semanas.

Para ensayar si la inhibición del crecimiento por mAb G6-31 estaba acompañada de cambios en el nivel de expresión de parte de las moléculas de las principales vías de transducción de señales, se realizó un análisis de transferencia Western. Se recogieron adenomas yeyunales y la mucosa adyacente normal de los ratones tratados con mAb G6-31 y anticuerpo de control con un escalpelo, y se homogenizaron mecánicamente con el homogeneizador OMNI TH115 en tampón de lisis RIPA. Los anticuerpos primarios usados fueron policlonales de conejo contra p38 MAPK, p38 MAPK fosforilada, p42/p44 MAPK, p42/p44 MAPK fosforilada, PTEN, Akt, Akt fosforilada y GSK3 $\alpha$ /beta fosforilada (todos a 1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA). El anticuerpo secundario usado fue anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:5000, Chemicon).

Mientras que el nivel de expresión de muchas de las moléculas ensayadas se mantuvo sin cambios tras el tratamiento con mAb G6-31, se observó un modesto restablecimiento de los niveles de MAPK-p38 fosforilada en tres de cuatro muestras de tumor hacia los que se encuentran en la mucosa normal (Fig. 3L; p-p38, compárese T5-T8 con N5-N8).

#### Reducción de la densidad vascular en tumores tratados con mAb G6-31

Dado que se sabe que VEGF-A es un mitógeno para las células endoteliales vasculares a través de la señalización de VEGFR-2, se examinaron las redes vasculares tumorales en ratones tratados con Mab G6-31 e IgG de control mediante tinción inmunohistoquímica de cortes gruesos de tejido con anticuerpo anti-CD31 (Fig. 4A-B). Con el fin de generar imágenes con un microscopio confocal, los ratones recibieron perfusiones fijadas con paraformaldehído al 1 % (PFA) en PBS bajo anestesia con isofluorano, se extendió el tracto intestinal sobre una superficie de papel de filtro, se fijaron posteriormente con PFA al 4 % y se sumergieron en sacarosa al 30 % en PBS durante la noche a 4 °C antes de introducirlos en O.C.T. y congelarlos en hielo seco. Se recortaron los cortes congelados en trozos de 80  $\mu\text{m}$ , se fijaron en PFA al 4 % durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0,2 % en PBS, y se bloquearon durante 30 min con suero normal de cabra al 5 % en PBS con Triton-X -100 al 0,2 %. Se incubaron los anticuerpos primarios en tampón de bloqueo durante la noche, anticuerpos secundarios durante 5-6 horas, se lavaron con PBS y se contrastaron con Hoechst 33342 (0,5 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO). Los anticuerpos primarios usados fueron anticuerpo monoclonal de hámster contra CD31 (1:500, Chemicon, Temecula, CA), anticuerpo monoclonal de rata contra cadherina E (1:2500, Zymed, South San Francisco, CA) y anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con Cy3 contra actina de músculo liso (1:1000, Sigma). Los anticuerpos secundarios usados fueron anticuerpo de hámster anti-armenio conjugado con Cy5 (1:500, Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, RU) y anticuerpo anti-rata conjugado con Alexa 488 (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR).

Se cuantificó la densidad de los vasos de los tumores de los ratones  $\text{Apc}^{\text{min/+}}$  a partir de imágenes digitales adquiridas con una cámara CCD en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan2 (Thomwood, NY). Cada uno de los cuatro grupos (ratones tratados durante 3 o 6 semanas con IgG de control o mAb G6-31) consistió en dos ratones, y se analizaron 11-22 tumores de cada grupo. Se calculó la superficie de los vasos de los cortes tumorales de 80  $\mu\text{m}$  a través de una segmentación basada en umbrales de fluorescencia positiva en CD31 usando ImageJ v.1.36 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A continuación, se calculó la densidad de los vasos como la proporción de los píxeles positivos en CD31 con respecto a la superficie total del tumor. Se calculó la media de los valores de todos los tumores de cada grupo, proporcionando un valor medio para el grupo.

La cuantificación de la densidad de los vasos indicó que el componente vascular de los tumores de los ratones tratados con mAb G6-31 se redujo en comparación con el observado en los ratones tratados con IgG de control (Fig. 4C). Tras tres semanas de administración de la IgG de control, la densidad superficial media de los vasos tumorales resultó ser del 23,2 %, mientras que se redujo hasta el 18,6 % tras la administración con mAb G6-31. La superficie media de los vasos de los tumores tratados con IgG de control durante seis semanas fue del 25,5 %, mientras que la densidad superficial media de los vasos de los tumores de los ratones tratados con mAb G6-31 fue del 19,7 %.

#### Discusión

Se usaron ratones  $\text{Apc}^{\text{min/+}}$  para investigar el papel de VEGF-A en la tumorigénesis intestinal benigna. En la primera parte, los experimentos se diseñaron para medir los efectos del tratamiento a corto y a largo plazo de anti-VEGF-A de adenomas intestinales sometidos a un gran crecimiento. Se ha demostrado que el tratamiento con mAb anti-

VEGF-A G6-31 redujo significativamente la carga tumoral y prolongó la supervivencia de los ratones  $Apc^{min/+}$ .

Se han realizado varios estudios sobre el efecto de los agentes dietéticos y quimiopreventivos, incluyendo los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), en la carga tumoral de los ratones  $Apc^{min/+}$  (revisado en Corpet *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12:391-400 (2003)), de los cuales existe una lista actualizada en <http://corpet.net/min>. Muchos de estos estudios informan de una reducción significativa en el número de tumores. Los AINE tales como piroxicam y sulindac, que se dirigen tanto a COX-1 como a COX-2, han estado entre los agentes más potentes para suprimir la formación de tumores en ratones  $Apc^{min/+}$  (Boolbol *et al.*, *Cancer Res.* 56:2556-2560 (1996), Chiu *et al.*, *Cancer Res.* 57:4267-4273 (1997), Hansen-Petrik *et al.*, *Cancer Lett.* 175:157-163 (2002), Rittland *et al.*, *Carcinogenesis* 20:51-58 (1999)), además de los inhibidores selectivos de COX-2 tales como celecoxib (Jacoby *et al.*, *Cancer Res.* 60:5040-5044 (2000)) y A-285969 (Wagenaar-Miller *et al.*, *Br. J. Cancer* 88:1445-1452 (2003)). Las terapias de combinación también se han usado con éxito para reducir el número de tumores. Torrance *et al.* utilizaron un inhibidor específico del receptor del factor de crecimiento epidérmico, EKI-785, en combinación con sulindac, y demostraron una eliminación casi total del número de tumores (Torrance *et al.*, *Nat. Med.* 6:1024-1028 (2000)). Del mismo modo, el efecto combinado de los agentes quimioterapéuticos raltitrexed (RTX) y 5-fluorouracilo (FU) produjo una reducción significativa (37 %) de los números de tumores  $Apc^{min/+}$  (Murphy *et al.*, *Cancer Biol. Ther.* 3:1169-1176 (2004)). Recientemente, la administración a corto plazo del inhibidor del receptor tirosina quinasa (RTK) AZD2171 demostró una reducción de la carga tumoral en el modelo de  $Apc^{min/+}$  (Goodlad *et al.*, *Carcinogenesis* 27:2133-2139 (2006)). Observaron que el inicio temprano del tratamiento (a las 6 semanas) con AZD2171 fue capaz de reducir el número de tumores, mientras que la intervención tardía (a las 10 semanas) solo redujo el tamaño de los tumores (Goodlad *et al.*, *supra*). Sin embargo, el tratamiento no tuvo efecto sobre la densidad vascular (Goodlad *et al.*, *supra*). AZD2171 inhibe varios RTK incluyendo, pero sin limitación, VEGFR-1, -2 y -3 (Wedge *et al.*, *Cancer Res.* 65:4389-4400 (2005)).

Los presentes inventores han observado que el Mab anti-VEGF-A G6-31 administrado a las 13 semanas no redujo el número de tumores existentes, a pesar de que disminuyó el tamaño de los tumores y pareció inhibir la formación de nuevos adenomas. Estos resultados se correlacionaron con el aumento observado de la supervivencia. Sin embargo, se cree que es posible que un enfoque de prevención de tumores específico de anti-VEGF (con un inicio del tratamiento temprano) sea más eficaz para reducir el número de tumores que el enfoque de intervención de los tumores (con un inicio del tratamiento tardío) que se usó en el estudio de los presentes inventores. Independientemente, la inhibición específica de anti-VEGF fue eficaz en todas las fases de crecimiento de los tumores.

El presente estudio demuestra de manera concluyente que la orientación de VEGF-A es suficiente para lograr profundos efectos terapéuticos en el modelo de  $Apc^{min/+}$ . La comparación de la inhibición sistémica de VEGF-A con Mab G6-31 con una delección genética de VEGF-A en el compartimiento epitelial intestinal solo en ratones  $Apc^{min/+}$ ;  $VEGF^{lox}$ ; Villin-Cre sugiere que, además de las células epiteliales, otras fuentes celulares de VEGF-A desempeñan un papel importante en el crecimiento de los adenomas  $Apc^{min/+}$ . Estas fuentes adicionales de VEGF-A incluyen potencialmente células mononucleares (Sunayama *et al.*, *Carcinogenesis* 23:1351-1359 (2002)) y fibroblastos del estroma (Seno *et al.*, *Cancer Res.* 62:506-511 (2002), (Williams *et al.*, *J. Clin. Invest.* 105:1589-1594 (2000)). El análisis *in situ* de los presentes inventores indica expresión de VEGF-A extra-epitelial dentro de los adenomas y de las vellosidades normales, lo que apoya la observación.

Basándose en un amplio conjunto de datos, es concebible que gran parte de los efectos antitumorales observados de mAb G6-31 está mediada por la supresión de la angiogénesis (Wise *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96:3071-3076 (1999), Zachary *et al.*, *Cardiovasc. Res.* 49:568-581 (2001)). De hecho, se ha observado un suministro vascular reducido en respuesta al anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A en estudios de xenoinjertos tumorales (Borgstrom *et al.*, *Prostate* 35:1-10 (1998)). De acuerdo con esto, se observó una reducción de la densidad superficial de los vasos de los adenomas intestinales  $Apc^{min/+}$  después de tres y seis semanas de administrar mAb G6-31, en comparación con los tumores de los ratones tratados con IgG de control.

La acumulación significativa observada de adenomas *inferiores* a 1 mm tras la inhibición de VEGF-A sugiere que, en los adenomas intestinales de los ratones  $Apc^{min/+}$ , se puede producir un cambio angiogénico antes de lo que en general se cree para el desarrollo de tumores, como se ha visto en el modelo de  $Apc^{\Delta 716}$  (Seno *et al.*, *Cancer Res.* 62:506-511 (2002)).

Una conclusión importante e inesperada del estudio de los presentes inventores es que la monoterapia antiangiogénica, dirigida a un único factor angiogénico, puede ser muy eficaz en la supresión del crecimiento tumoral y puede producir un beneficio en la supervivencia. Esto parece contrastar con el punto de vista, adoptado principalmente a partir de la investigación de tumores malignos, de que el principal beneficio de una terapia de este tipo es "normalizar" los vasos sanguíneos del tumor con el fin de facilitar la administración de la quimioterapia (Jain *et al.*, *Nat. Med.* 7:987-989 (2001)). Es concebible que una menor propensión de los tumores benignos a adquirir mutaciones, que pueden conducir a la resistencia al tratamiento, puede explicar, al menos en parte, la diferencia. Por lo tanto, los datos de los presentes inventores sugieren la posibilidad de un tratamiento no quirúrgico para los tumores benignos, sin la necesidad de agentes quimioterapéuticos.

## Referencia

**Ejemplo 2. El anticuerpo monoclonal anti-VEGF inhibe el crecimiento de adenomas hipofisarios y reduce el nivel de prolactina y de hormona del crecimiento en suero en un modelo murino de neoplasia endocrina múltiple**

La neoplasia endocrina múltiple (MEN) es un trastorno caracterizado por la incidencia de tumores que afectan a dos o más glándulas endocrinas. Un paciente se clasifica con MEN de tipo 1 (MEN1) cuando se identifica una aparición combinada de los tumores en las glándulas paratiroides, las células de los islotes pancreáticos y la hipófisis anterior. Se descubrieron las mutaciones en el gen *MEN1* como subyacentes al trastorno, lo que comúnmente genera el truncamiento o la ausencia de la proteína menina (revisado en Pannett *et al.*, *Endocr. Relat. Cancer* 6:449-473 (1999)). Con el hallazgo adicional de una pérdida frecuente del alelo restante en los tumores, (Bystrom *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:1968-1972 (1990); Debelenko *et al.*, *Cancer Res.* 57:2238-2243 (1997), Larsson *et al.*, *Nature* 332:85-87 (1988)), *MEN1* se ha clasificado como un gen supresor de tumores. Aunque *MEN1* se hereda en gran medida como un trastorno autosómico dominante, las mutaciones *de novo* del gen *MEN1* se han identificado como la causa de los casos esporádicos de MEN1.

La función de la menina sigue siendo desconocida. Se ha sugerido que la proteína de 610 aminoácidos predominantemente nuclear de expresión ubicua participa en la regulación de la transcripción, el procesamiento y la reparación del ADN, y la organización del citoesqueleto a través de sus interacciones *in vitro* con parte de las proteínas de las vías anteriormente mencionadas (revisado en Agarwal *et al.*, *Horm. Metab. Res.* 37:369-374 (2005)). Sin embargo, ninguna de las interacciones de las proteínas identificadas hasta el momento proporciona una explicación a la tumorigenicidad de MEN1.

El patrón actual de tratamiento para los tumores de páncreas - más del 50 % de los cuales son gastrinomas y del 10 al 30 % son insulinomas - es la reducción de la producción de ácido basal en el caso de los gastrinomas, mientras que la cirugía se considera el tratamiento óptimo para los insulinomas. El tratamiento para los tumores hipofisarios consiste en una cirugía selectiva con diferentes terapias médicas en función del perfil hormonal, mientras que el tratamiento definitivo para los tumores paratiroides es una extirpación quirúrgica de la glándula hiperactiva. Sin embargo, hay una variabilidad en el grado y en la sincronización de la paratiroidectomía (revisado en Brandi *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:5658-5671 (2001)). Los últimos avances en la generación de nuevos enfoques para el diagnóstico y el tratamiento de MEN1 se han revisado recientemente (Viola *et al.*, *Curr. Opin. Oncol.* 17:24-27 (2005)).

A través de la recombinación homóloga, los exones 3-8 del gen *Men1* de ratón han sido objeto de delección (Crabtree *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98:1118-1123 (2001)). A los nueve meses de vida, se informó de ratones heterocigóticos para *Men1* que desarrollaron lesiones en los islotes pancreáticos con observaciones adicionales frecuentes de adenomas paratiroides. Se observaron más tumores y de mayor tamaño en los islotes pancreáticos, paratiroides, tiroides, corteza suprarrenal e hipofisarios a los 16 meses de edad (Crabtree *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98:1118-1123 (2001)), de manera notablemente similar al trastorno humano.

Existen numerosas pruebas que indican que el bloqueo de la angiogénesis mediada por VEGF-A produce la supresión de los tumores (Gerber *et al.*, *Cancer Res.* 60:6253-6258 (2000), Holash *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 99:11393-11398 (2002), Millauer *et al.*, *Nature* 367:576-579 (1994), Prewett *et al.*, *Cancer Res.* 59:5209-5218 (1999), Wood *et al.*, *Cancer Res.* 60:2178-2189 (2000)), y se ha usado como enfoque anti-VEGF-A en el tratamiento de diversos modelos preclínicos derivados de líneas celulares de cáncer maligno humano (revisado en Geber *et al.*, *Cancer Res.* 60:2178-2189 (2000)). Sin embargo, los xenoinjertos tumorales resumen mal el desarrollo de tumores en un entorno natural. Además, hasta la fecha, no se ha probado el tratamiento con anticuerpos anti-VEGF-A en la inhibición del crecimiento de los tumores benignos o los tumores de origen endocrino. Para investigar el papel de VEGF-A en el desarrollo de adenomas específicos de tejidos endocrinos, se examinaron los efectos de la terapia antiangiogénica en un modelo de tumor no maligno natural, el modelo de ratón de *Men1<sup>+/-</sup>* de MEN1. Se analizó el volumen tumoral de adenomas hipofisarios en ratones *Men1<sup>+/-</sup>*, así como los trasplantes de tumores hipofisarios subcutáneos en ratones Balb/c desnudos después de un tratamiento a corto plazo con el antagonista específico del VEGF a modo de ejemplo, anticuerpo monoclonal (mAb) anti-VEGF-A. Además, se investigó la posibilidad de la reducción de los niveles elevados de la hormona asociados con MEN1 con mAb anti-VEGF-A.

Para los experimentos descritos a continuación, se adquirieron ratones *Men1<sup>+/-</sup>* (número de reserva 004066) en el Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y ratones Balb/c desnudos en Charles River Laboratories Inc. (Wilmington, MA). Se obtuvieron ratones hembra *Men1<sup>+/-</sup>* experimentales de antecedentes 129-FVB mixtos mediante el entrecruzamiento de machos y hembras *Men1<sup>+/-</sup>*. Se alojaron los animales en jaulas de microaislamiento en una instalación de barrera alimentaron a voluntad. Los protocolos de mantenimiento de los animales y experimentales se realizaron siguiendo las regulaciones federales y aprobadas por el comité institucional de cuidado y uso de animales.

**El tratamiento con mAb G6-31 inhibe el crecimiento de adenomas hipofisarios Men<sup>1+/-</sup>**

Para investigar si la terapia anti-VEGF-A sería eficaz en la inhibición del crecimiento de adenomas hipofisarios, se sometieron 125 ratones hembra Men<sup>1+/-</sup> de 11 a 13 meses de vida a MRI para identificar los ratones con tumores hipofisarios. Se sometieron los ratones portadores de tumores a generación de imágenes de nuevo 14 y 28 días más tarde para establecer la tasa de crecimiento de los adenomas. Una cohorte de nueve ratones con un 12,4 % de crecimiento tumoral medio al día y 15,58 ± 4,0 mm<sup>3</sup> (± ETM) de volumen tumoral medio al inicio del estudio recibieron IgG de control, y una cohorte de ocho ratones con el 10,2 % de crecimiento tumoral medio al día y 16,70 ± 5,7 mm<sup>3</sup> de volumen tumoral medio al inicio del estudio recibieron un mAb anti-VEGF-A G6-31 durante 67 días o hasta que los ratones se encontraron moribundos. Para el tratamiento con mAb G6-31 y anticuerpos IgG de control, se administró una inyección intraperitoneal a 5 mg/kg de mAb anti-VEGF G6-31 (Liang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:951-961 (2005)) o IgG de control del mismo isotipo (anti-GP120) una vez a la semana en un volumen de 100-200 µl en PBS. La administración de ocho (mAb G6-31) o nueve (IgG de control) ratones Men<sup>1+/-</sup> con adenoma hipofisario *in situ* se inició a los 13,5-14,5 meses de edad y se continuó durante 67 días o hasta que los ratones se encontraron moribundos. El tratamiento de 23 (IgG de control) o 35 (mAb G6-31) ratones Balb/c desnudos con un trasplante de adenoma hipofisario subcutáneo se inició cuatro meses después del injerto, y continuó durante 35 días o hasta que los ratones se encontraron moribundos o el volumen tumoral hubo alcanzado los 3.000 mm<sup>3</sup>.

Se sometieron los animales a MRI cada dos semanas durante el seguimiento del crecimiento de los adenomas hipofisarios *in vivo*. Se adquirieron imágenes de MRI en un imán de taladro horizontal 9.4T (Oxford Instruments Ltd., Oxford, RU) y se controlaron mediante una consola Varian Inova (Varian, Inc., Palo Alto, CA) usando una bobina de 3 cm de volumen para la transmisión y la recepción (Varian, Inc.). Se empleó una secuencia de imágenes de eco de espín rápido con un tiempo de repetición de 4 segundos, longitud de los trenes de eco de 8, espaciado del eco de 12 ms, tiempo de eco eficaz de 48 ms y seis medias. La matriz de la imagen era 128<sup>2</sup>, con un campo de visión (20 mm)<sup>2</sup> y un espesor del portaobjetos de 0,5 mm. Se forzaron los ratones a mantenerse en posición pronadora con isoflurano al 2 % en aire médico, y se monitorizó la temperatura corporal con una sonda rectal y se mantuvo a 37 °C con aire caliente durante la adquisición de imágenes de 15 minutos. Tras la generación de imágenes, se dejó que los animales se recuperaran en una superficie caliente, tas lo que se devolvieron a la instalación de alojamiento. Se calcularon los volúmenes de los tumores hipofisarios primarios a partir de datos de MRI usando las regiones tridimensionales de interés dibujadas en el software Analyze (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa, KS).

A los treinta y nueve días de tratamiento, se observó una disminución estadísticamente significativa del volumen medio de los tumores hipofisarios en el grupo tratado con mAb G6-31 en comparación con el grupo tratado con IgG de control (Fig. 5A). En el punto final del estudio (67 días), se había producido una reducción estadísticamente significativa del 72 %, o de 3,7 veces, en el volumen tumoral medio tras el tratamiento con mAb G6-31, con un valor de p inferior a 0,016. Mientras que la mayoría (6 de los 9) de los tumores Men<sup>1+/-</sup> tratados con IgG de control siguió creciendo vigorosamente durante todo el período de tratamiento, el crecimiento de 7 de los 8 adenomas hipofisarios tratados con mAb G6-31 se ralentizó considerablemente (Fig. 5B). Se sacrificaron cuatro animales tratados con IgG de control y tres ratones tratados mAb G6-31 antes del punto final del estudio debido a problemas de salud, incluyendo un ratón tratado con IgG de control antes de exponerlo al tratamiento el día 25. La supervivencia sin duplicación del tumor fue significativamente mayor en el grupo tratado con mAb G6-31 con un valor de p en rango logarítmico < 0,019 (Fig. 5C), lo que sugiere que la inhibición del crecimiento de los tumores hipofisarios mejoró la salud de los ratones, en comparación con los ratones tratados con IgG de control. El volumen tumoral de dos ratones del grupo de tratamiento con mAb G6-31 no se había duplicado hacia día 67 de tratamiento.

**El anticuerpo anti-VEGF-A inhibe el crecimiento de trasplantes de adenomas hipofisarios subcutáneos**

Para ensayar la eficacia del tratamiento con anticuerpos anti-VEGF-A en un modelo de trasplante de adenoma hipofisario Men<sup>1+/-</sup>, se establecieron tumores subcutáneos en el costado de ratones hembra Balb/c desnudos de 6-8 semanas de vida de acuerdo con el siguiente procedimiento. Para estos experimentos, se extrajo un solo adenoma hipofisario *in situ* de un ratón Men<sup>1+/-</sup> y se picó en trozos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, se mezclaron con membrana basal de matriz BD Matrigel (BD, Bedford, MA) y se inocularon por vía subcutánea en un volumen de 200 µl en el costado dorsal de ratones Balb/c desnudos. Cuatro meses después, se extrajo un solo tumor subcutáneo (volumen aproximado de 900 mm<sup>3</sup>), se picó, se mezcló con Matrigel y se inoculó como se ha descrito anteriormente para establecer una cohorte de ratones con trasplantes de adenomas hipofisarios.

Se midió el tamaño tumoral de los trasplantes de adenomas hipofisarios subcutáneos con una herramienta de calibración (Fred V. Fowler Co. Inc., Newton, MA) cogiendo el diámetro mayor del tumor y el diámetro perpendicular al mismo. Se calculó el volumen tumoral usando la siguiente fórmula:  $V = \pi ab^2/6$  (a = diámetro mayor del tumor, b = diámetro perpendicular).

Una cohorte de 35 ratones con un volumen tumoral medio de 515 ± 42 mm<sup>3</sup> al inicio del tratamiento recibió mAb G6-31 y una cohorte de 23 ratones con un volumen tumoral medio de 527 ± 64 mm<sup>3</sup> al inicio del estudio recibió la IgG de control durante 35 días usando los métodos descritos anteriormente. En el punto final del estudio, los tumores tratados con IgG de control casi habían cuadruplicado sus volúmenes, a una media de 2.071 ± 152 mm<sup>3</sup>, mientras que el crecimiento de los tumores de los ratones tratados con mAb G6-31 se había detenido esencialmente; siendo

volumen tumoral medio de  $556 \pm 89 \text{ mm}^3$  en el día 35 (Fig. 5D). Se produjo una reducción estadísticamente significativa del 73 %, o de 3,7 veces, del volumen tumoral medio tras el tratamiento con mAb G6-31, con un valor de  $p < 1,9 \times 10^{-12}$ .

- 5 Estos datos establecen que el mAb anti-VEGF-A G6-31 es eficaz en la inhibición del crecimiento de adenomas hipofisarios y de trasplantes de adenomas hipofisarios subcutáneos por igual, predispuestos por la heterocigosidad de Men1.

#### Expresión de VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 en hipófisis normal y tejido tumoral hipofisario

10 Para investigar el nivel de expresión de VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 en el tejido hipofisario, y para examinar si su nivel de expresión se veía afectado por el tratamiento con mAb G6-31, se comparó la expresión relativa media de VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 en cinco adenomas hipofisarios *in situ* tratados con IgG de control (volumen medio de  $96,2 \pm 8,7 \text{ mm}^3$ ) y cinco adenomas hipofisarios *in situ* tratados con mAb G6-31 ( $35,2 \pm 4,0 \text{ mm}^3$ ), junto con cinco adenomas hipofisarios pequeños no tratados de la misma edad ( $9,7 \pm 2,9 \text{ mm}^3$ ), cuatro hipófisis normales de la misma edad de ratones Men1<sup>+/-</sup> y ocho muestras de hipófisis de tipo silvestre de la misma edad. También se examinó la expresión de VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 en cinco trasplantes de adenoma hipofisario tratados con IgG de control (volumen medio de  $2.063 \pm 205 \text{ mm}^3$ ) y cinco trasplantes de adenoma hipofisario tratados con mAb G6-31 ( $577 \pm 45 \text{ mm}^3$ ).

20 Para estos experimentos, se preparó ARN exento de ADN total a partir de adenomas hipofisarios ultracongelados o hipófisis normales con el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó una RT-PCR cuantitativa de una sola etapa en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$  con el kit qRT-PCR de una etapa SuperScript III Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 ng de ARN total, 45 nM de cada cebador de PCR y sonda Taqman 12,5 nM. Para detectar la expresión de los genes de interés, se usaron las siguientes mezclas de cebadores y sondas del ensayo de expresión de genes TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA): VEGF-A (ID del ensayo: Mm00437304\_ml), VEGFR-1 (ID del ensayo: Mm00438980\_ml) y VEGFR-2 (ID del ensayo: Mm00440099\_ml). Se detectó la expresión de GAPDH usando los cebadores y la sonda Taqman sintetizados internamente (Secuencia del cebador directo: ATGTTCCAGT ATGACTCCAC TCACG (SEQ ID NO: 3); Secuencia del cebador directo inverso: GAAGACACCA GTAGACTCCA CGACA (SEQ ID NO: 4); secuencia de la sonda Taqman: AAGCCCATCA CCATCTTCCA GGAGCGAGA (SEQ ID NO: 5))

25 Las reacciones se llevaron a cabo usando el sistema de PCR en tiempo real 7500 de Applied Biosystems, con las siguientes condiciones: una etapa de transcripción inversa (15 minutos a 48 °C), seguida de una etapa de desnaturalización (2 minutos a 95 °C) y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Los niveles de expresión génica en cada muestra se determinaron con el método de cuantificación relativa (método de ddCt), usando el gen GAPDH como control endógeno, y ARN total de placenta de ratón (Clontech, Mountain View, CA) como referencia.

40 En particular, la expresión relativa media de VEGF-A se elevó significativamente en los adenomas *in situ* tratados con mAb G6-31 en comparación con los tumores hipofisarios tratados con IgG de control, los tumores pequeños no tratados y las hipófisis normales de tipo silvestre o ratones Men1<sup>+/-</sup> (Fig. 6). La expresión de VEGF-A fue comparativamente alta en ambas muestras de trasplantes de tumores subcutáneos. El alto nivel observado de transcripción de VEGF-A en los tumores tratados con mAb G6-31 puede ser el resultado de un mecanismo compensatorio para el secuestro sistémico de VEGF-A por parte de mAb G6-31. Sin embargo, parece que los niveles elevados de VEGF-A no fueron suficientes para impulsar el crecimiento del tumor.

45 Aunque la expresión relativa media de VEGFR-1 pareció razonablemente invariable en las diferentes muestras de tejido, la expresión relativa media de VEGFR-2 pareció menor en las muestras de tumores *in situ* tratados con IgG de control o mAb G6-31 en comparación con la encontrada en los trasplantes tumorales, en los tumores pequeños no tratados o en las hipófisis normales de tipo silvestre y ratones Men1<sup>+/-</sup> (Fig. 6).

#### La MRI permite el seguimiento *in vivo* del crecimiento tumoral

55 Se usó la MRI como se ha descrito anteriormente para el seguimiento del crecimiento de los adenomas hipofisarios *in situ* durante todo el período de tratamiento sometiendo a los animales a la obtención de imágenes cada dos semanas. En la Figura 7, se muestran las gráficas de un corte coronal del cerebro con un adenoma representativo de un ratón Men1<sup>+/-</sup> tratado con IgG de control y de un ratón Men1<sup>+/-</sup> tratado con mAb G6-31, tomado a los días 9, 39 y 67 días de iniciarse el tratamiento.

#### 60 Histología de los tumores hipofisarios y pancreáticos

Los adenomas hipofisarios Men1<sup>+/-</sup> resultaron ser histológicamente similares en los ratones tratados con mAb G6-31 y con IgG de control (Fig. 8A-B). Para estos experimentos, se deshidrató tejido fijado con formalina y se introdujo en parafina, se cortó y se tiñó con hematoxilina-eosina (H&E) para el análisis histológico siguiendo los protocolos convencionales. Por lo general, las células tumorales eran pequeñas (~10 micrómetros de diámetro), con una alta

proporción de núcleo/citoplasma, a menudo mitóticamente activas, con un máximo de 40 figuras mitóticas por cada diez campos de 625 micrómetros de diámetro. Los tumores eran variablemente sólidos o quísticos, con múltiples vasos revestidos de células endoteliales, zonas agudamente hemorrágicas (glóbulos rojos intactos en espacios no revestidos por endotelio, ausencia de fibrina u organización celular), y macrófagos cargados de hemosiderina dispersos, en consonancia con la hemorragia anterior. Había necrosis monocelular variable y fibrosis mínima. Los vasos tumorales estaban espaciados irregularmente, normalmente de 5-10 micrómetros de diámetro sin embargo, rara vez, tan grandes como de 50 micrómetros, con pocas células del estroma perivascular no tumorales.

Se observó el patrón vascular entre los tumores tratados con IgG de control y mAb G6-31 mediante tinción inmunohistoquímica indirecta con un anticuerpo marcador de células panendoteliales MECA-32 (Fig. 8C-D). Para estos experimentos, se desparafinaron cortes de tejidos fijados con formalina e introducidos en parafina antes de la inactivación de la actividad de la peroxidasa endógena y del bloqueo de avidina y biotina (Vector, Burlingame, CA). Se bloquearon los cortes durante 30 minutos con suero de conejo normal al 10 % en PBS con BSA al 3 %. A continuación, se incubaron los cortes de tejido con anticuerpos primarios durante 60 minutos, anticuerpos secundarios biotinilados durante 30 minutos, y se incubaron en reactivo ABC (Vector, Burlingame, CA) durante 30 minutos, seguido de una incubación de 5 minutos en DAB Metal Enhanced (Pierce, Rockford, IL). Se contrastaron los cortes con hematoxilina de Mayer. Los anticuerpos primarios usados eran anticuerpos de cabra anti-prolactina de ratón a 0,1 µg/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) y antígeno de células panendoteliales anti-ratón de rata, el clon MECA32, a 2 µg/ml (BD Biosciences, San Jose, CA). Los anticuerpos secundarios usados eran anticuerpos biotinilados de conejo anti-cabra a 7,5 µg/ml (Vector, Burlingame, CA) y anticuerpos biotinilados de conejo anti-rata a 2,5 µg/ml (Vector, Burlingame, CA). La tinción de antígeno de células panendoteliales requirió un tratamiento previo con Target Retrieval (Dako, Carpintería, CA) a 99 °C durante 20 minutos. Todas las demás etapas se realizaron a temperatura ambiente.

La densidad de los vasos se redujo significativamente mediante el tratamiento con mAb G6-31 hasta el 46 % de la de los tumores tratados con IgG de control (valor de  $p = 0,009$ ; Fig. 8I). En ambos grupos de tratamiento, la vascularización tumoral fue menor que en la hipófisis anterior adyacente normal. Para la cuantificación de la densidad vascular, se analizaron cortes teñidos con MECA-32 con una plataforma de exploración de diapositivas Ariol SL-50 (Applied Imaging, San Jose, CA), usando un objetivo de 10 aumentos. Se identificaron las regiones del tumor hipofisario y se señalaron de forma manual. Se definieron los colores de los píxeles correspondientes a la tinción con MECA-32, y se midió correspondientemente la superficie vascular. Se identificaron los núcleos de las células tumorales por el color del píxel y la forma del objeto. Entonces, se normalizó la superficie vascular con respecto al número de células tumorales hipofisarias. Los islotes pancreáticos se analizaron de manera similar, excepto que la superficie teñida con MECA-32 se normalizó con respecto a la superficie de los tumores de los islotes.

Además de tumores hipofisarios, se identificaron con frecuencia tumores de los islotes pancreáticos en los ratones Men1<sup>+/-</sup> tratados, y se analizaron histológicamente en el punto final del estudio. Los tumores de los islotes (definidos como de un tamaño superior a  $10^5 \mu\text{m}^2$  en el plano de corte), por lo general, eran sólidos, sin hemorragia ni necrosis significativas. Los tumores de los seis animales tratados con Mab anti-VEGF-A G6-31 ( $n = 32$  tumores) promediaron solo el 39 % de la superficie de los de los cinco animales tratados con IgG de control ( $n = 45$  tumores; valor de  $p = 0,026$ ). Los adenomas pancreáticos (Fig. 8E-F) tratados con IgG de control parecían, en general, más grandes (hasta 7,0 mm en el plano de corte) y más vasculares que los adenomas tratados con mAb G6-31 (diámetro del tumor de hasta 5,0 mm en el plano de la sección). En cuatro de los siete ratones tratados con IgG de control, los tumores pancreáticos contenían espacios revestidos por endotelio, de pared fina, rellenos de sangre y dilatados de hasta 300 µm de diámetro, mientras que los adenomas pancreáticos de los ratones tratados con mAb G6-31, con frecuencia, carecían de vascularización prominente (Fig. 8G-H). Los tumores pancreáticos de uno de los ocho ratones tratados con mAb G6-31 presentaron vasos dilatados. Se encontraron intermitentemente macrófagos cargados de hemosiderina en tumores pancreáticos con cualquiera de los tratamientos, que sugieren hemorragia en los islotes.

La densidad vascular en los tumores de los islotes se redujo significativamente mediante el tratamiento con G6-31 hasta el 56 % de la de los tumores de los islotes tratados con IgG de control (valor de  $p = 2 \times 10^{-7}$ ). También, los islotes "normales" (menos de  $10^5 \mu\text{m}^2$  en el plano de corte) de los ratones tratados con Mab G6-31 tenían una densidad vascular reducida, en menor magnitud, hasta el 76 % de la de los animales tratados con IgG de control (valor de  $p = 4 \times 10^{-7}$ ; véase la Figura 8J). Un solo animal macho, tratado con IgG de control, resultó tener un tumor solitario en la corteza suprarenal de 12 mm de diámetro, un tipo de tumor reconocido en las glándulas del síndrome MEN1.

La histología de los trasplantes de adenomas hipofisarios subcutáneos fue comparable a la de los tumores hipofisarios *in situ*, lo que indica una recapitulación exitosa del crecimiento del tumor endocrino en locus distantes.

#### Adenomas hipofisarios y prolactinomas Men1

Aproximadamente el sesenta por ciento de los adenomas hipofisarios en pacientes MEN1 secretaron prolactina (PRL), menos de 25 %, hormona de crecimiento (GH), y el 5 %, hormona adrenocorticotrópica (ACTH, Trump *et al.*,

QJM 89:653-669 (1996)). Para examinar si los adenomas hipofisarios de ratones Men1<sup>+/-</sup> secretan PRL, se realizó la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-PRL en adenomas hipofisarios *in situ* tratados con IgG de control y mAb G6-31, así como en trasplantes de tumores hipofisarios. Seis de los seis adenomas hipofisarios tratados con IgG de control y cinco de los cinco tratados con mAb G6-31 mostraron tinción positiva específica para la prolactina en aproximadamente el 50-95 % de las células que se establecieron como prolactinomas (Fig. 9A-9B). De acuerdo con este resultado, Crabtree *et al.* informaron que tumores hipofisarios Men1<sup>TSM/+</sup> fueron positivos para PRL en una tinción inmunohistoquímica (Crabtree *et al.*, *Proc. Natl. Sci. EE.UU.* 98:1118-1123 (2001)). La tinción con prolactina también fue positiva en los trasplantes de adenomas hipofisarios con cualquiera de los tratamientos (Fig. 9C 9D). Coincidiendo con la secreción funcional de prolactina de estos tumores, el tejido mamario de ratones hembra portadores de adenomas hipofisarios trasplantados mostró invariablemente un cambio de moderado a notable en la lactancia, en los animales tratados tanto con IgG de control como con anti-VEGF-A (Fig. 9 E, F).

Según la evaluación mediante tinción inmunohistoquímica, 6 de los 11 tumores hipofisarios primarios no tratados fueron focal y débilmente positivos en la hormona de crecimiento (Fig. 14A), mientras que solo uno de los cuatro tumores hipofisarios trasplantados mostraron tinción débil focal (Fig. 14B). La expresión de la hormona del crecimiento estuvo presente en los tumores hipofisarios *in situ* tratados tanto con G6-31 como con IgG de control (Fig. 6C, D). La hipófisis anterior normal mostró una potente reactividad en ~20-30 % de las células. (Fig. 14A).

#### Los niveles de prolactina en suero se correlacionan con el volumen de los tumores hipofisarios en los ratones no tratados y tratados con IgG de control y se reduce mediante el tratamiento con mAb G6-31

Dado que todos los adenomas hipofisarios tratados con IgG de control y mAb G6-31 examinados de ratones Men1<sup>+/-</sup> fueron positivos en prolactina mediante análisis inmunohistoquímico, se investigó si los niveles de PRL en suero eran elevados en los ratones portadores de adenomas hipofisarios Men1<sup>+/-</sup>. Con este fin, se analizaron inicialmente 46 ratones hembra Men1<sup>+/-</sup> no tratados para determinar el estado de sus tumores hipofisarios y el nivel de PRL en suero, y cinco controles de hembras de la misma camada de tipo silvestre para el nivel de PRL en suero. Las cantidades de prolactina en suero se analizaron mediante el Programa Nacional de Hormonas y Péptidos de Harbor UCLA (Torrance, CA).

El intervalo de edades de estos ratones fue de 15,6 a 10,5 meses, con una edad media de 13,3 meses. El nivel medio de PRL en suero de los ratones de tipo silvestre fue de  $43,8 \pm 25,3$  ( $\pm$  ETM) ng/ml. Veintisiete de los 46 ratones Men1<sup>+/-</sup> no tenían tumor hipofisario detectable mediante análisis de MRI. El nivel medio de PRL en suero de estos ratones fue de  $69,0 \pm 24,6$  ng/ml. Un grupo de diez ratones tuvo un tumor hipofisario pequeño con un volumen medio de  $1,7 \pm 0,6$  mm<sup>3</sup>. El nivel de PRL en suero de estos ratones se elevó hasta una media de  $188,7 \pm 61,9$  ng/ml. Nueve ratones que tenían un tumor hipofisario de gran tamaño (volumen medio  $83,1 \pm 23,8$  mm<sup>3</sup>), tuvieron un nivel medio de PRL en suero de  $13.239,8 \pm 3.466,5$  ng/ml. Estos datos establecen que existe una correlación positiva entre los niveles de PRL en suero y el volumen del tumor hipofisario en ratones Men1<sup>+/-</sup> (Fig. 10A) con un coeficiente de correlación de Pearson  $R = 0,94$ , lo que sugiere que el nivel de PRL en suero podría ser útil como herramienta de diagnóstico en el establecimiento de una estimación del estado del tumor hipofisario.

Para examinar si el tratamiento con anti-VEGF-A tuvo un efecto sobre los niveles de PRL en suero, se analizó el suero de siete ratones Men1<sup>+/-</sup> tratados con IgG de control y con mAb G6-31 con un adenoma hipofisario *in situ* en el de punto final del estudio (día 67). En los ratones de tratados con IgG de control, el nivel medio de PRL en suero se elevó hasta  $12.566,7 \pm 3.047,4$  ng/ml y, por lo general, aumentó con un volumen tumoral creciente (media de  $116,2 \pm 18,5$  mm<sup>3</sup>) con  $R = 0,80$  ( $p < 0,03$ ). En los ratones Men1<sup>+/-</sup> tratados con mAb G6-31 analizados, el nivel de PRL en suero se mantuvo por debajo, en  $5.163,7 \pm 1.608,9$  ng/ml. Sin embargo, no hubo ninguna correlación estadística evidente con el volumen tumoral (volumen tumoral medio de  $35,3 \pm 6,5$  mm<sup>3</sup>),  $R = 0,12$  con  $p < 0,80$  (Fig. 10B). No obstante, estos datos indican que aunque el mAb G6-31 inhibe el crecimiento del adenoma hipofisario, también conduce a una reducción del nivel medio de PRL en suero, en comparación con los ratones tratados con IgG de control con  $p < 0,053$ .

#### El tratamiento con anti-VEGF-A reduce los niveles de PRL en suero en ratones con trasplantes de tumores hipofisarios subcutáneos

Aunque los datos anteriores indican que el tratamiento con anticuerpos anti-VEGF-A reduce el nivel de PRL en suero en ratones Men1<sup>+/-</sup> portadores de tumores, se siguió investigando esto en el contexto de los trasplantes de adenomas hipofisarios subcutáneos en ratones Balb/c desnudos. Se midió la PRL en suero en muestras procedentes de 23 ratones tratados con IgG de control y 35 ratones tratados con mAb G6-31, extraídos en el inicio del tratamiento (día 1) y en el punto final del estudio (día 35). Aunque la PRL media en suero del día 1 fue comparable entre los dos tratamientos, el tratamiento con mAb G6-31 del día 35 tuvo niveles significativamente reducidos de PRL en suero (Fig. 10C y D, respectivamente).

Como el tratamiento actual de los prolactinomas MEN1 incluye terapia médica o hipofisectomía selectiva seguida de radioterapia, los presentes datos que indican que el tratamiento con mAb G6-31 conduce a un menor nivel de PRL en suero con una inhibición destacada del crecimiento del tumor ofrecen un posible nuevo enfoque terapéutico para los pacientes MEN1.

### Los niveles de insulina en suero están elevados en ratones Men1<sup>+/-</sup>

Para examinar si los niveles de insulina en suero estaban elevados en ratones Men1<sup>+/-</sup>, se analizaron muestras de suero de seis ratones no en ayunas tratados con IgG de control, y de seis ratones no en ayunas tratados con mAb G6-31, todos ellos identificados con lesiones pancreáticas en el análisis histológico. También se analizaron los niveles de insulina en suero de cinco ratones de tipo silvestre no en ayunas de la misma edad usando un kit de ELISA de insulina ultrasensible de ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mercodia, Uppsala, Suecia). No se observó correlación con el tratamiento, pero la insulina media en suero se elevó notablemente en los ratones Men1<sup>+/-</sup> (IgG de control, 3,8 ± 2,6 ng/ml; mAb G6-31, 3,7 ± 2,4 ng/ml) en comparación con los ratones de tipo silvestre (1,4 ± 0,7 ng/ml (± ETM)).

### Discusión

Los presentes datos indican que se requiere VEGF-A para el crecimiento de adenomas hipofisarios benignos en el modelo de ratón de MEN1, pues la terapia con un anticuerpo monoclonal contra VEGF-A ha demostrado ser suficiente para la inhibición del crecimiento tumoral.

Basándose en la bibliografía disponible, es posible que gran parte de los efectos antitumorales observados de mAb G6-31 estén mediados por la supresión de la angiogénesis dependiente de VEGFR-2 (Wise *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:3071-3076 (1999) y Zachary *et al.*, *Cardiovasc. Res.* 49:568-581 (2001)). Mientras que la expresión media relativa del ARNm de VEGFR-2 en grandes adenomas hipofisarios no se vio afectada significativamente por el tratamiento con anti-VEGF-A (Fig. 6), la tinción inmunohistoquímica con MECA-32 mostró reducciones altamente significativas en la vascularización (reducción del aproximadamente 50 %) en tumores hipofisarios y tumores de páncreas tratados con Mab G6-31. Se observó una reducción correspondiente en el crecimiento tumoral tratado con anti-VEGF-A tanto en adenomas hipofisarios como pancreáticos. La densidad vascular en los islotes pancreáticos normales también se redujo significativamente mediante el tratamiento con anti-VEGF-A, aunque la magnitud del cambio (reducción del 25 % del tratado con IgG de control) fue inferior a la observada en los adenomas pancreáticos.

El alto nivel observado de transcripción de VEGF-A en los tumores tratados con Mab G6-31 es potencialmente el resultado de un mecanismo de compensación para el secuestro sistémico de VEGF-A por parte de Mab G6-31. Sin embargo, parece que un nivel tan elevado de VEGF-A no fue suficiente para impulsar el crecimiento del tumor.

Además de demostrar que una monoterapia con tratamiento de anti-VEGF-A y mAb G6-31 redujo significativamente la carga tumoral de los ratones Men1<sup>+/-</sup> mediante la inhibición eficaz del crecimiento de los adenomas, se ha demostrado que el nivel de prolactina en suero también se redujo. Por lo tanto, los presentes datos sugieren la posibilidad de un tratamiento no quirúrgico de los tumores benignos endocrinos, con un cese de la progresión de la enfermedad sin el uso de agentes quimioterapéuticos. Como alternativa, dicho bloqueo de VEGF-A se puede combinar con un agente farmacológico. Por ejemplo, para los adenomas secretores de prolactina, un antagonista de VEGF-A se puede combinar con un agonista de dopamina.

### Ejemplo 3. Eficacia de la intervención de anti-VEGF y eficacia de la regresión/supervivencia en el modelo RIP-TβAg de carcinogénesis en múltiples fases

Para comprender mejor el papel de las terapias anti-VEGF en las diversas fases de crecimiento de los tumores, se recurrió a una serie de modelos de tumores preclínicos, incluyendo el RIP-TβAg. RIP-TβAg (Exelixis, Inc.) es una versión condicional de un modelo de tumor de islotes pancreáticos de ratón impulsado por la expresión transgénica del antígeno T grande de SV40 (TAg (dirigido a la célula β pancreática, donde TAg funciona como un potente oncogén mediante la unión tanto a p53 como a Rb). RIP-TβAg es fenotípicamente similar al modelo RIP-TAG que se ha descrito previamente (Hanahan, *Nature* 315:115-122 (1985); Bergers *et al.*, *Science* 284 (808-811), 1999). Los presentes inventores han encontrado que este modelo progresa a través de una serie de fases cada vez más agresivas, incluyendo el activador de la señalización de VEGF y un "cambio angiogénico" (es decir, la iniciación del proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos) en aproximadamente 5 semanas. Los tumores pequeños se forman en 10 semanas, coincidiendo con el inicio de su conversión maligna. Los carcinomas grandes invasivos se forman en 12 semanas. Por lo tanto, antes de las 10 semanas de edad, los crecimientos de células en los ratones no se consideran malignos ni metastásicos. El período entre 10-12 semanas de edad, en general, incluye la formación de un cáncer invasivo.

Para estos experimentos, se alojaron ratones RIP-TβAg y se trataron de acuerdo con las recomendaciones convencionales de la IACUC, los ratones recibieron comida alta en azúcar y agua con sacarosa al 5 % para aliviar los síntomas de hiperinsulinemia causados por el aumento de células beta secretoras de insulina en el páncreas. A las 9-9,5 u 11-12 semanas de edad, los ratones se trataron dos veces a la semana con una inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de anticuerpo anti-VEGF o anticuerpo monoclonal de control anti-ambrosía del mismo isotipo en solución salina tamponada con fosfato estéril. En el "ensayo de intervención", los ratones de 9-9,5 semanas de edad se trataron durante 14 días y luego se examinaron. En el "ensayo de regresión", los ratones de 11-12 semanas de edad se examinaron después de 7, 14 y 21 días de tratamiento. Para examinar la supervivencia, se trató otra cohorte de

ratones hasta que los ratones mostraron morbilidad o mortalidad. En cada punto de tiempo definido en los ensayos de intervención y de regresión, se extirpó el páncreas y el bazo de cada ratón, y se fotografiaron. El número de tumores del páncreas se determinó por disección de cada tumor esférico y realizando el recuento. Se determinó la carga tumoral midiendo los dos diámetros mayores de cada tumor, y calculando el volumen mediante el cálculo del volumen esferoide (multiplicando  $x^2$  entre  $y$ ) multiplicado por 0,52. Se sumó el volumen de todos los tumores del páncreas de un ratón para determinar la carga tumoral total. Se calcularon las medias y las desviaciones típicas, y los datos se representaron gráficamente usando Microsoft Excel v11.3.3 (Microsoft, Inc.). Las comparaciones estadísticas entre el número de tumores y la carga tumoral de los diferentes grupos se llevaron a cabo usando la prueba t de Student. Las curvas de Kaplan-Meier para el análisis de la supervivencia se generaron usando JMP 6.0 (SAS Institute, Inc.) y las comparaciones estadísticas llevadas a cabo mediante un análisis de rango logarítmico.

El tratamiento de los animales de 9 semanas de vida (el ensayo de "intervención") con anticuerpos anti-VEGF dio como resultado una reducción espectacular de la angiogénesis tumoral (FIGURA 11). El tratamiento de los animales de 11 semanas de vida (el "ensayo de regresión") dio lugar a una disminución de la vascularización y la proliferación tumoral (FIGURA 12A). Sin embargo, en contraste con el ensayo de intervención, solo se detectó una reducción transitoria en el crecimiento tumoral y no hubo efecto sobre la supervivencia (FIGURA 12B). Estos estudios demostraron que estos tumores tempranos son más sensibles a los agentes terapéuticos dirigidos anti-VEGF en comparación con los tumores avanzados.

#### **Ejemplo 4. Anti-VEGF y la quimioterapia son eficaces en los modelos preclínicos**

La cirugía puede dejar células tumorales residuales o nódulos micrometastásicos latentes que tengan el potencial para volver a activar el "programa angiogénico" y facilitar el crecimiento tumoral más exponencial.

Los presentes inventores han usado tumores genéticos de ratón y xenoinjertos humanos para modelizar la latencia de los tumores mediante el uso de potentes regímenes de quimioterapia para "citorreducir" el tumor simultáneamente a o secuencialmente con terapias anti-VEGF, seguidas de terapia de mantenimiento con anticuerpos monoclonales anti-VEGF. Por lo tanto, se está tratando al ratón para prevenir la reaparición de un tumor, en lugar de perseguir un tumor una vez formado o vuelto a formar, incluyendo, en algunos casos, un tumor que sea refractario, de recaída o resistente a más tratamientos, incluyendo las terapias anti-VEGF dirigidas. La Figura 13 muestra la observación de que el docetaxel es muy eficaz en la reducción de la carga tumoral, pero las células latentes vuelven a crecer después de aproximadamente 2 meses. Sin embargo, el tratamiento concurrente con anti-VEGF suprime el rebrote del tumor, a pesar de que tiene poco impacto por sí mismo sobre el crecimiento de los tumores más grandes y más establecidos. Datos adicionales demuestran que la terapia anti-VEGF prolongada también suprime el rebrote de tumores después de la citorreducción con taxanos o gemcitabina. Estos resultados demuestran que se puede usar anti-VEG para bloquear de manera eficaz el crecimiento o rebrote de tumores o micrometástasis latentes. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la neovascularización es un requisito previo para la expansión clonal rápida asociada con la formación de tumores macroscópicos, y apoyan el uso de antagonistas específicos del VEGF (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF, incluyendo, pero sin limitación, los anticuerpos de la serie G6 o B20) en el mantenimiento de la latencia de los tumores y la supresión del rebrote de los tumores después del tratamiento inicial de los mismos y antes de la formación de nuevos tumores, de la reactivación de los tumores latentes, tumores malignos o micrometástasis.

#### **Ejemplo 5. Terapia neoadyuvante con el uso de bevacizumab**

El presente ejemplo ilustra el uso de bevacizumab en una terapia neoadyuvante de pacientes con cáncer de mama palpable y operable.

La quimioterapia neoadyuvante se ha usado ampliamente en el tratamiento de cánceres de mama de gran tamaño localmente avanzados o potencialmente operables. Los ensayos aleatorizados han demostrado que la quimioterapia neoadyuvante reduce la necesidad de mastectomía (preservando, por tanto, la mama), con tasas de supervivencia global similares a la quimioterapia adyuvante. Powles *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 13:547-52 (1995); Fisher *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 16:2672-85 (1998).

Los objetivos principales de la presente terapia son proporcionar mejores beneficios clínicos mediante la adición de bevacizumab a la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama palpable y operable. En concreto, una de las mediciones principales de la eficacia clínica de la terapia neoadyuvante puede ser las tasas de respuesta completa patológica (pCR). Otras mediciones incluyen las tasas de respuesta global (OR), las tasas de respuesta clínica completa (cCR), la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (OS). Además, se pueden monitorizar los efectos secundarios del tratamiento mediante, por ejemplo, las tasas de complicaciones quirúrgicas, la toxicidad y los efectos adversos sobre la función cardíaca. La expresión de ciertos genes u otras actividades de biomarcadores también se pueden usar como marcadores de la respuesta al tratamiento.

La respuesta completa patológica (pCR) se ha usado como un marcador de pronóstico de la eficacia del tratamiento. La pCR se refiere a la falta de evidencia histológica residual de tumor después de la terapia neoadyuvante en el momento de la cirugía. Los estudios han sugerido que los pacientes que alcanzaron la pCR tienen una

supervivencia significativamente mejor. Sin embargo, no existe un método convencional para la clasificación de la respuesta patológica, y sigue siendo controvertido el uso de la pCR como marcador de la eficacia.

Los pacientes adecuados para la terapia neoadyuvante con antagonistas específicos del VEGF se seleccionan basándose en criterios y en directrices predeterminadas, que varían dependiendo del tipo de cáncer en particular que esté en tratamiento. Por ejemplo, los pacientes se pueden seleccionar basándose en su esperanza de vida, edad, histología del cáncer, funciones hematológica/hepática y cardíaca, historial del tratamiento, estado y planes reproductivos, y los estados psiquiátricos o adictivos; y lo que es más importante, el tumor primario debe ser medible y/u operable.

Los regímenes de tratamiento incluyen quimioterapia más antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab. Opcionalmente, también se pueden usar uno o más agentes terapéuticos adicionales en el régimen. Por lo general, el régimen de quimioterapia comúnmente usado para el tipo de cáncer en particular (por ejemplo, régimen terapéutico convencional) se usa en combinación con bevacizumab. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer de mama de manera neoadyuvante, se puede usar un régimen de docetaxel, paclitaxel o doxorubicina/ciclofosfamida (AC) en combinación con bevacizumab. Como alternativa, el régimen basado en docetaxel o basado en paclitaxel y de AC se puede usar de forma secuencial como quimioterapia combinada con bevacizumab. Para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, se puede usar cisplatino (ya sea solo o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos tales como gemcitabina, docetaxel o vinorelbina) como agente quimioterapéutico principal en combinación con bevacizumab. Por otra parte, para el tratamiento del cáncer colorrectal, se pueden usar regímenes basados en 5-FU (tales como FOLFOX) en combinación con bevacizumab.

Los agentes quimioterapéuticos y el antagonista específico de VEGF, por ejemplo, bevacizumab, se administran a los pacientes a dosis e intervalos indicados, para un número de ciclos. Por ejemplo, bevacizumab se puede dar a 15 mg/kg cada 3 semanas durante 4 ciclos, o a 10 mg/kg cada dos semanas durante 6 ciclos. En otro ejemplo, el antagonista específico del VEGF, por ejemplo, bevacizumab, se administra a 7,5 mg/kg una vez cada dos o tres semanas. Los pacientes son monitorizados para determinar la respuesta durante el tratamiento. Tras la finalización de la terapia neoadyuvante, los pacientes se someten a cirugía para extirpar el tumor primario, que bien ya era operable antes de la terapia neoadyuvante o se vuelve operable en respuesta a la terapia neoadyuvante. Después de la cirugía, los pacientes continúan con el tratamiento con antagonista específico de VEGF, por ejemplo, bevacizumab, con o sin quimioterapia, dependiendo del estado en particular del paciente. Opcionalmente, los pacientes también pueden someterse a radioterapia. El progreso del paciente es monitorizado durante todo el tratamiento y después del tratamiento.

Los acontecimientos adversos (AE) asociados con el tratamiento anti-VEGF también se deben monitorizar de cerca y tratar. Los principales AE conocidos a partir de estudios anteriores incluyen hipertensión, proteinuria, hemorragia, episodios tromboembólicos, perforación gastrointestinal/fistula y complicaciones en la cicatrización de la herida. Ciertos AE tales como la hipertensión pueden controlarse con medicamentos. Si los AE son graves y difíciles de tratar, se debe interrumpir el tratamiento.

Referencia

#### **Ejemplo 6. Terapia adyuvante con el uso de bevacizumab A**

El presente ejemplo ilustra el uso de bevacizumab en combinación con quimioterapia en el tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer reseado.

Los pacientes adecuados para la terapia adyuvante con bevacizumab se seleccionan basándose en criterios y directrices predeterminadas, que varían dependiendo del tipo de cáncer en particular sometido a tratamiento. Por ejemplo, los pacientes se pueden seleccionar basándose en su esperanza de vida, edad, histología del cáncer, funciones hematológica/hepática y cardíaca, estilo de vida, historial del tratamiento, estado y planes reproductivos, y los estados psiquiátricos o adictivos; y lo que es más importante, los pacientes deben haber sido sometidos a una resección completa de su cáncer antes del tratamiento adyuvante. Los tipos aceptados de resección dependen de los tipos concretos de los tumores. También, debe haber suficiente material patológico representativo del cáncer del paciente disponible para el análisis de la fase inicial y para la determinación de la eficacia. En el momento del tratamiento, la cirugía debe ser bastante reciente, pero el paciente debe estar completamente recuperado de la cirugía. Por ejemplo, los pacientes deben comenzar el tratamiento adyuvante no menos de 3-6 semanas y no más de 8-12 semanas después de la cirugía.

Los regímenes de tratamiento incluyen quimioterapia más bevacizumab. Opcionalmente, también se pueden usar uno o más agentes terapéuticos adicionales en el régimen. Por lo general, los agentes quimioterapéuticos en combinación con bevacizumab se usan durante la primera fase del tratamiento, seguidos de bevacizumab como tratamiento de mantenimiento de agente único para la fase restante. Por ejemplo, los pacientes se tratan con agentes quimioterapéuticos y bevacizumab durante aproximadamente 4 a 12 ciclos, después solo con bevacizumab hasta de 1 a 2 años. La duración de cada ciclo de tratamiento quimioterapéutico + bevacizumab depende de los agentes y de las dosis que se usen en concreto. Por ejemplo, el bevacizumab se puede dar a 15 mg/kg cada 3

semanas como un ciclo, o a 5 mg/kg cada dos semanas como un ciclo. En otro ejemplo, el bevacizumab se puede dar a 7,5 mg/kg o a 10 mg/kg cada dos o cada tres semanas.

5 El régimen de quimioterapia comúnmente usado para el tipo de cáncer en particular (por ejemplo, régimen terapéutico convencional) se usa en combinación con bevacizumab. Por ejemplo, para la terapia adyuvante del cáncer de mama, se puede usar un régimen de docetaxel, paclitaxel o doxorubicina/ciclofosfamida (AC) en combinación con bevacizumab. Como alternativa, el régimen basado en docetaxel o basado en paclitaxel y de AC se puede usar de forma secuencial como quimioterapia combinada con bevacizumab. Para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, se puede usar cisplatino (ya sea solo o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos  
10 tales como gemcitabina, docetaxel o vinorelbina) como agente quimioterapéutico principal en combinación con bevacizumab. Por otra parte, para el tratamiento del cáncer colorrectal, se pueden usar regímenes basados en 5-FU (tales como FOLFOX) en combinación con bevacizumab

15 El objetivo del tratamiento adyuvante con bevacizumab es mejorar la supervivencia del paciente, preferentemente la supervivencia libre de enfermedad. Entretanto, los acontecimientos adversos asociados con bevacizumab se deben monitorizar de cerca, sobre todo porque el tratamiento adyuvante es a largo plazo. La supervivencia se puede estimar mediante el método de Kaplan-Meier, y cualquier diferencia en la supervivencia se calcula usando la prueba estratificada de rango logarítmico. Se usa el análisis multivariable usando el modelo de riesgos proporcionales de Cox para estimar los efectos simultáneos de los factores de pronóstico sobre la supervivencia. Las interacciones con  
20 los factores de pronóstico se examinan con el modelo de riesgos proporcionales de Cox. El paquete de software estadístico SAS se usa para todos los cálculos. Los datos se consideran estadísticamente significativos cuando el valor de P es de 0,05 o inferior. Todos los ensayos estadísticos son de dos aspectos.

25 Los acontecimientos adversos (AE) asociados con el tratamiento anti-VEGF se deben monitorizar de cerca y tratar. Los principales AE conocidos a partir de estudios anteriores incluyen hipertensión, proteinuria, hemorragia, episodios tromboembólicos, perforación gastrointestinal/fístula y complicaciones en la cicatrización de la herida. Ciertos AE tales como la hipertensión pueden controlarse con medicamentos. Si los AE son graves y difíciles de tratar, se debe interrumpir el tratamiento

### 30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc. *et al.*

35 <120> Antagonistas específicos del VEGF para terapia adyuvante y neoadyuvante, y el tratamiento de tumores en fase temprana

<130> 50474/014WO6

40 <150> US 60/989.397

<151> 20-11-2007

<150> US 60/958.384

<151> 05-07-2007

45 <150> US 60/919.638

<151> 22-03-2007

<150> US 60/877.267

<151> 27-12-2006

50 <150> US 60/870.745

<151> 19-12-2006

<150> US 60/870.741

<151> 19-12-2006

55 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

60 <210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

# ES 2 582 656 T3

<223> sintético

<400> 1  
caacgtcact atgcagatca tgcg 24

5

<210> 2  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> sintético

<400> 2  
ggtctagttc ccgaaaccct gag 23

15

<210> 3  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223>- sintético

<400> 3  
atgtccagt atgactccac tcacg 25

25

<210> 4  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> sintético

35

<400> 4  
gaagacacca gtagactcca cgaca 25

40

<210> 5  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> sintético

<400> 5  
aagcccatca ccatctcca ggagcgaga 29

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, para su uso en un método de tratamiento, en donde:
- 5 (1) el anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo bloquean la unión de VEGF a más de un receptor de VEGF; y  
(2) el uso es en la reducción o la prevención de la aparición de un cáncer benigno, precanceroso o no metastásico en un sujeto con antecedentes familiares de cáncer, pólipos o síndrome canceroso heredado, en donde el sujeto nunca ha tenido un cáncer clínicamente detectable.
- 10 2. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho uso es una monoterapia.
- 15 3. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto se monitoriza además para determinar la aparición de dicho cáncer.
4. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer es un cáncer gastrointestinal, colorrectal, de mama, de ovario, de pulmón, glioblastoma o renal.
- 20 5. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho uso comprende además el uso de una terapia contra el cáncer adicional, en donde la terapia contra el cáncer adicional es, opcionalmente, quimioterapia.
- 25 6. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal.
- 30 7. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano.
8. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo monoclonal es bevacizumab.
- 35 9. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se unen al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1.
- 40 10. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se unen a un epítipo funcional en el VEGF humano que comprende los restos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, 191, K101, E103 y C104 del VEGF humano.
- 45 11. El anticuerpo anti-VEGF o el fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo anti-VEGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se unen a un epítipo funcional en el VEGF humano que comprende los restos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89 del VEGF humano.
- 50 12. Uso de un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de unión al antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo y el tratamiento son como se han definido en cualquier reivindicación anterior.

Figura 1

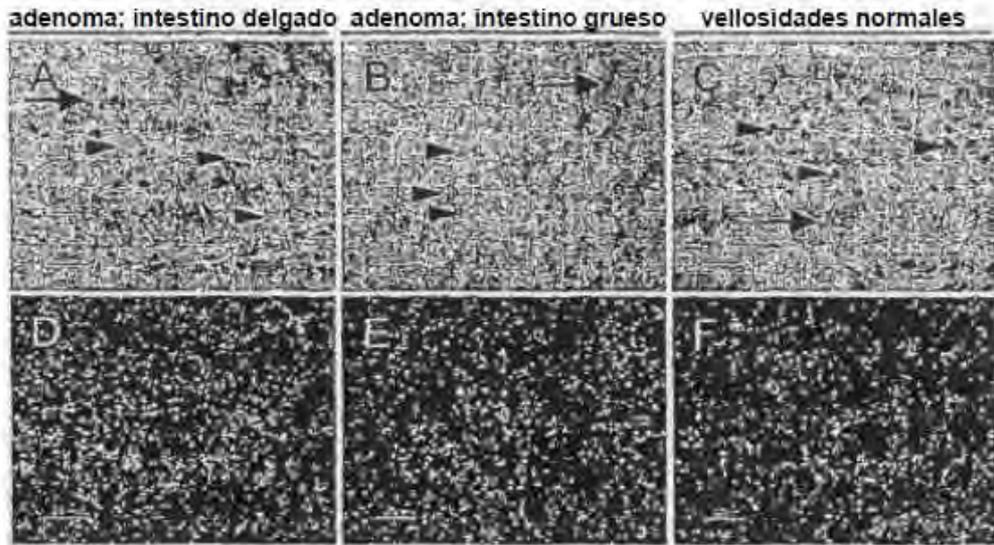


Figura 2

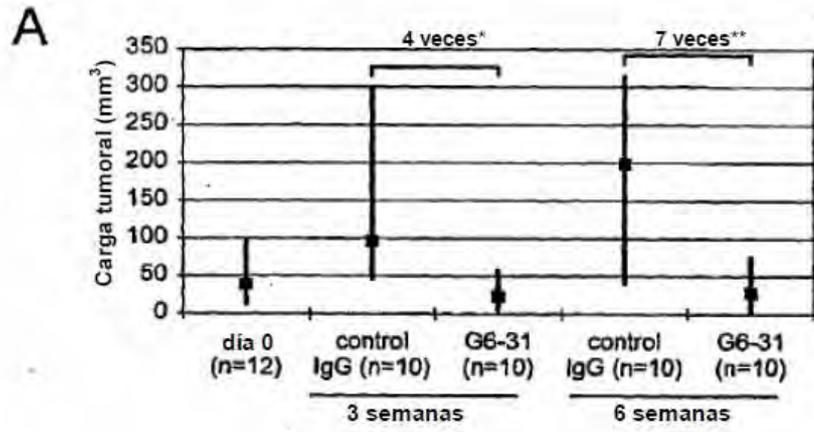


Figura 2

**B**

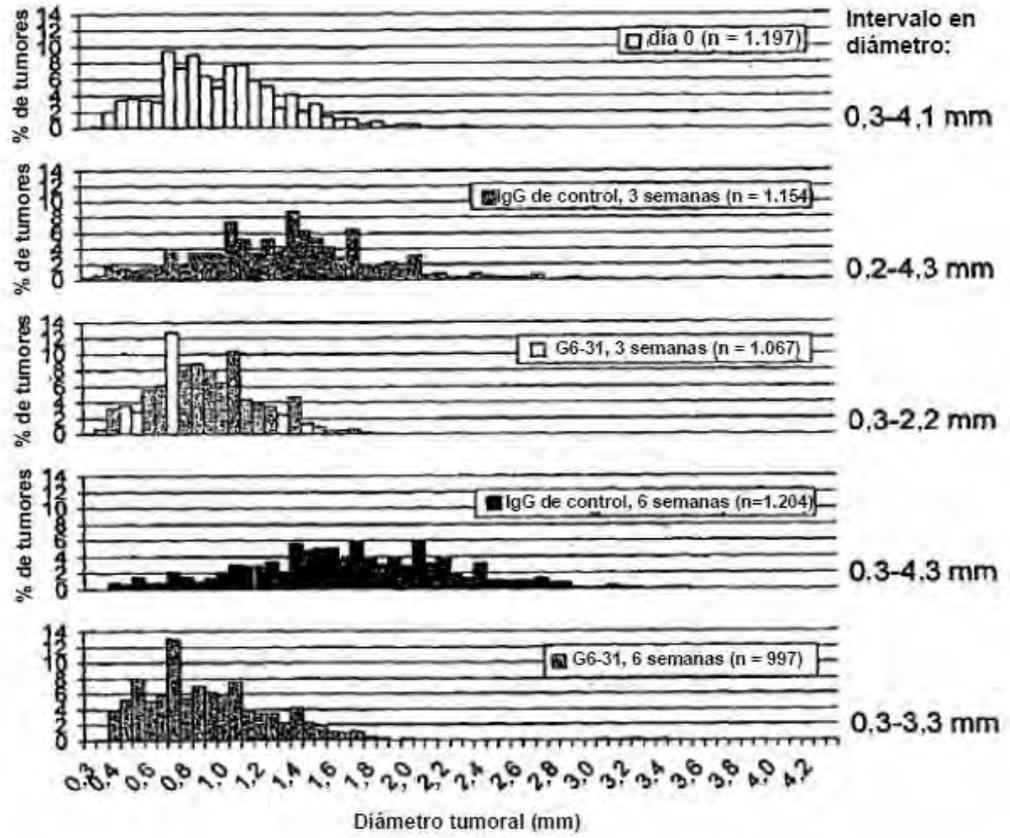


Figura 2

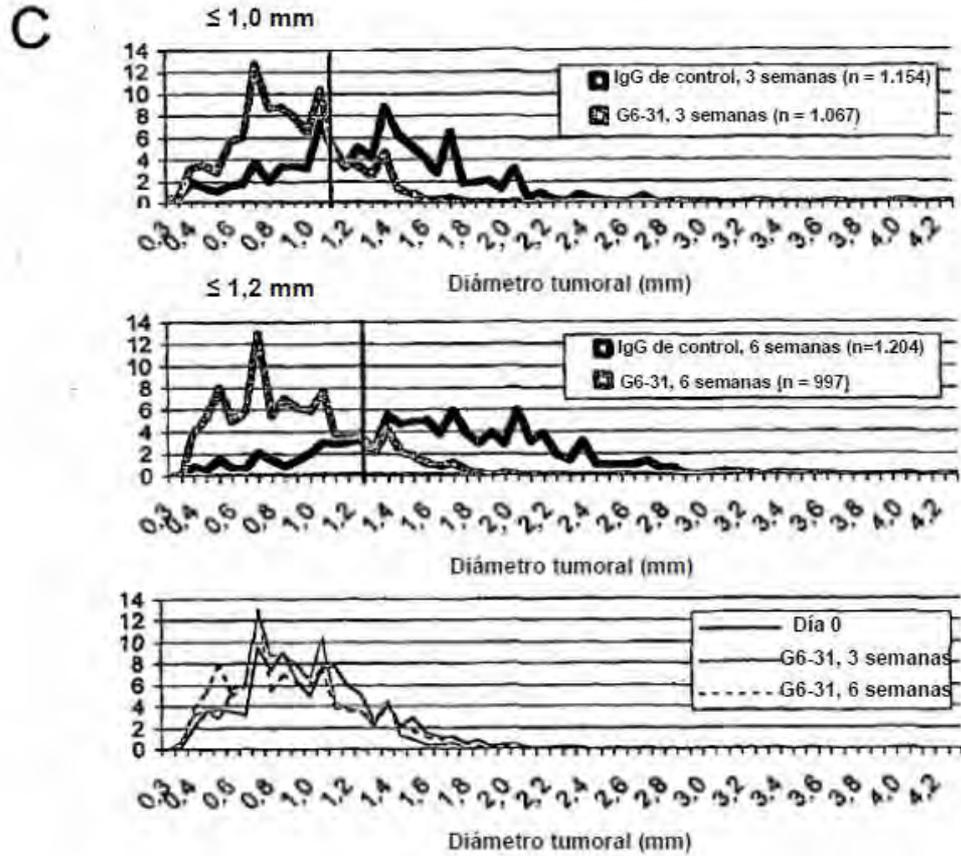


Figura 2

D

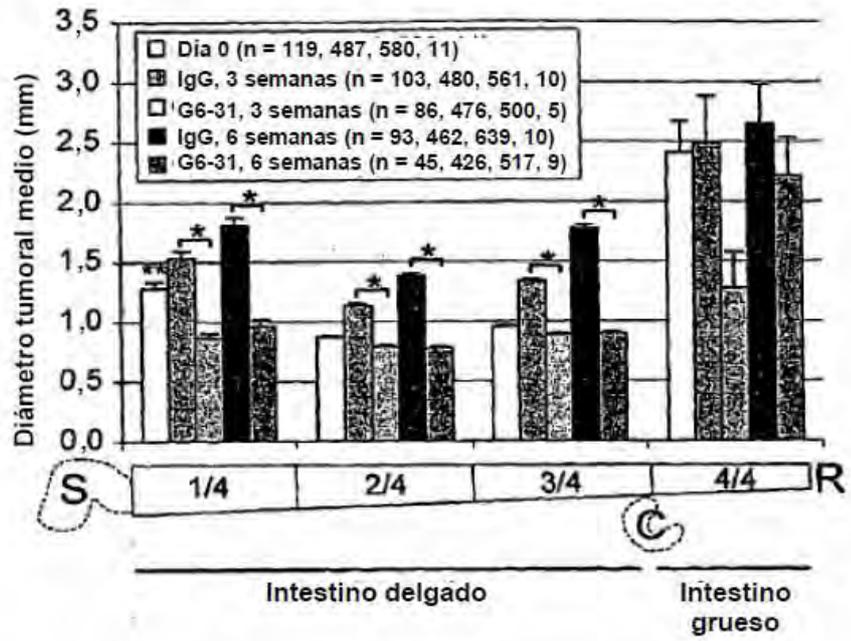
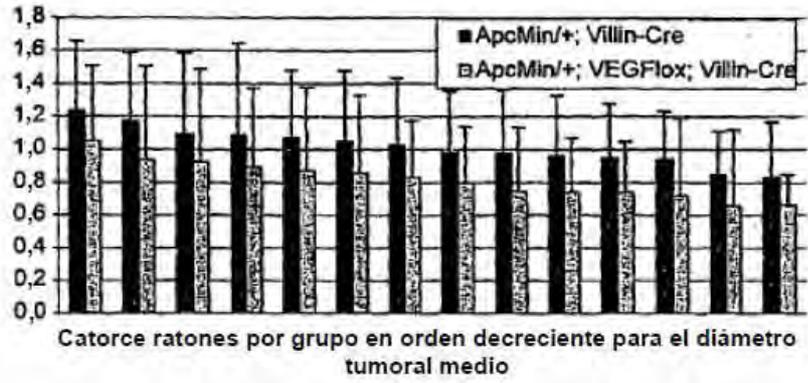


Figura 2

E



F

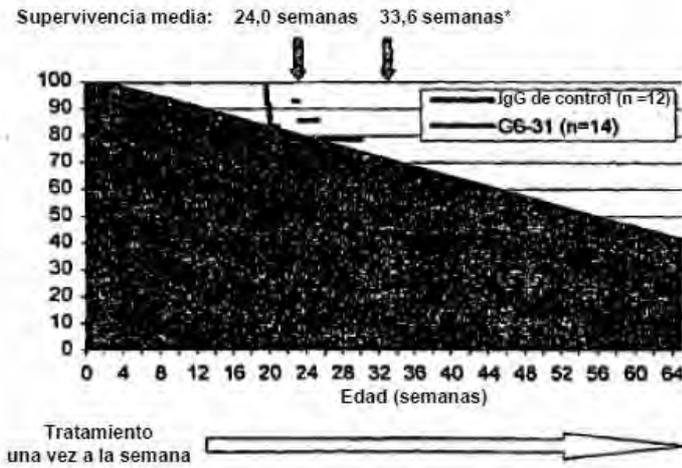


Figura 3

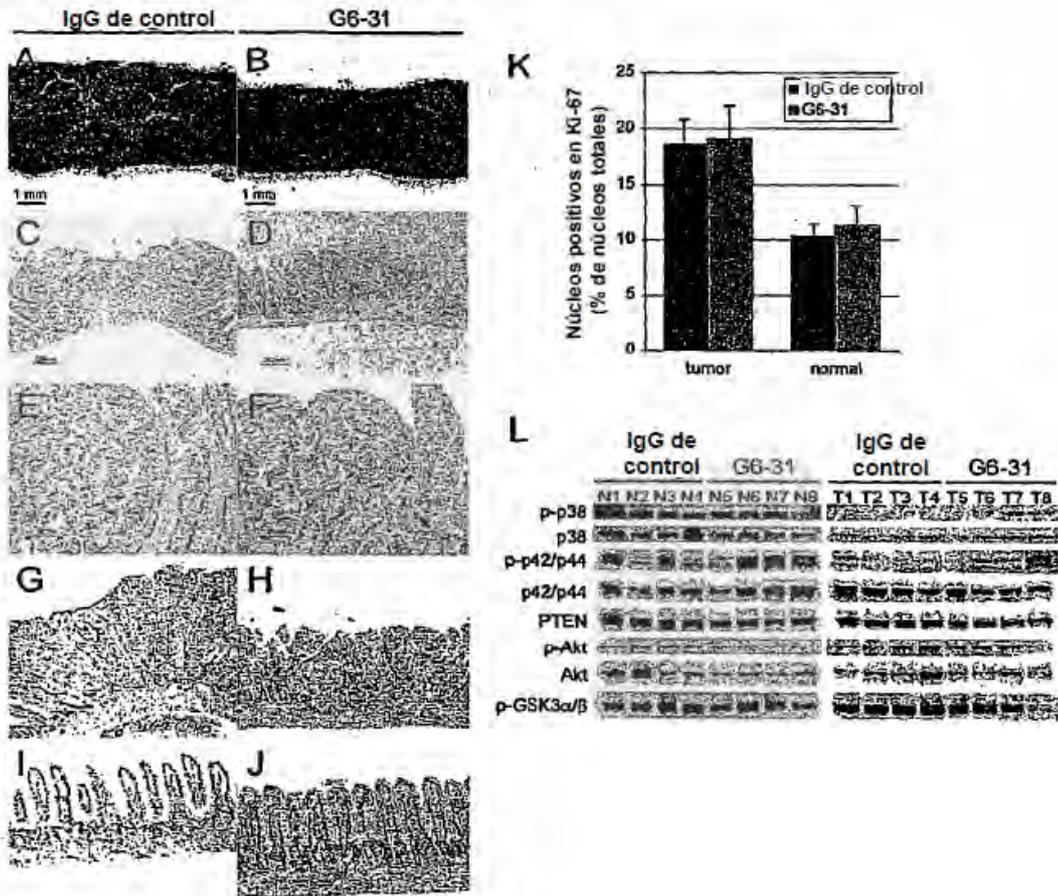


Figura 4

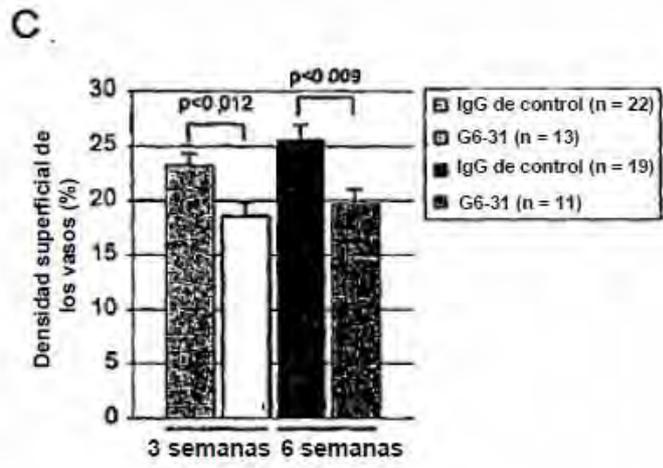
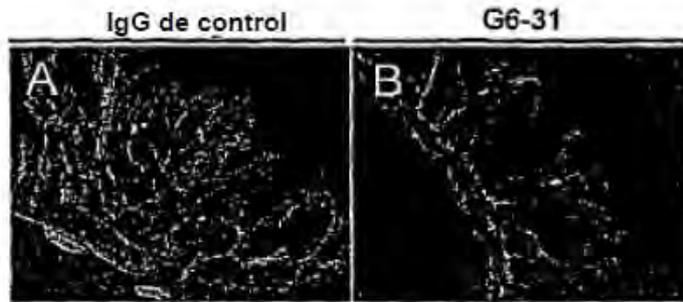


Figura 5

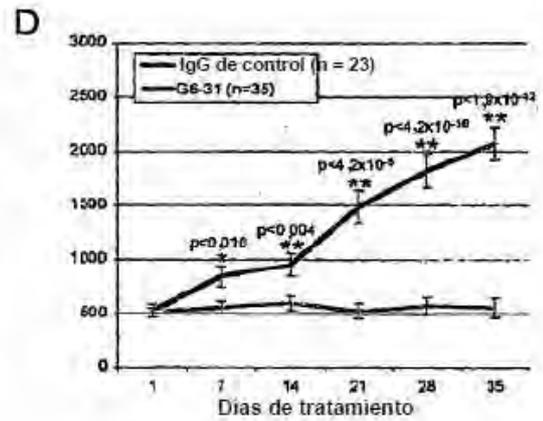
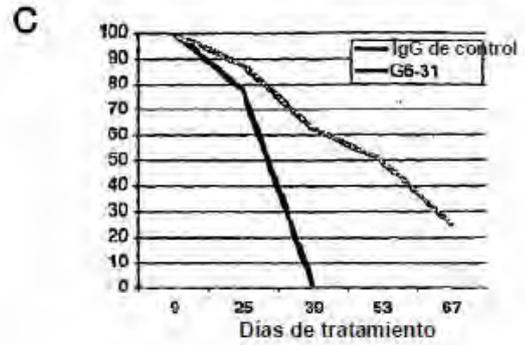
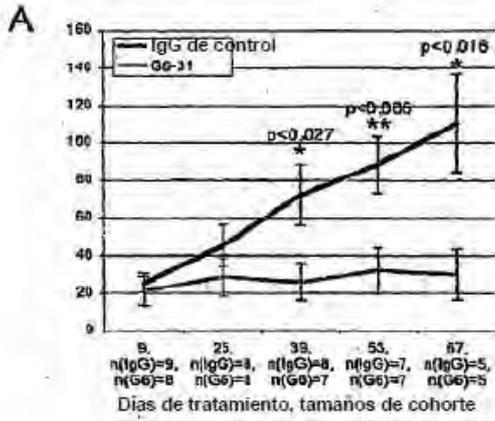


Figura 6

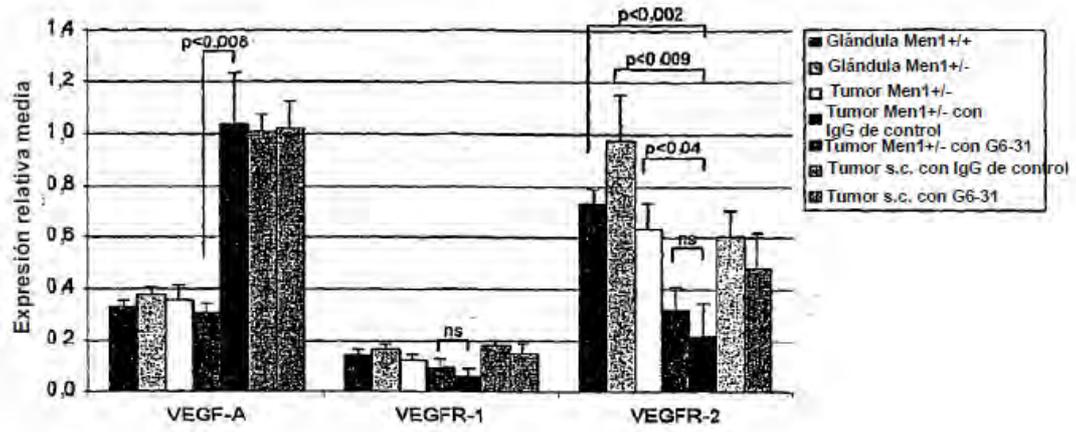


Figura 7

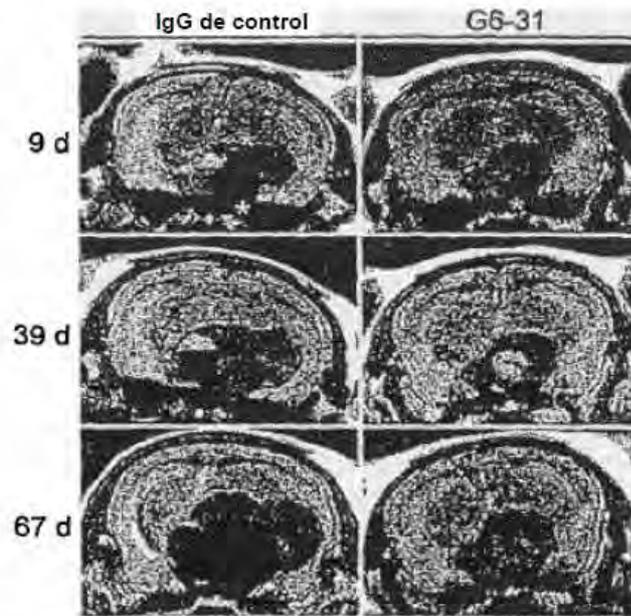


Figura 8

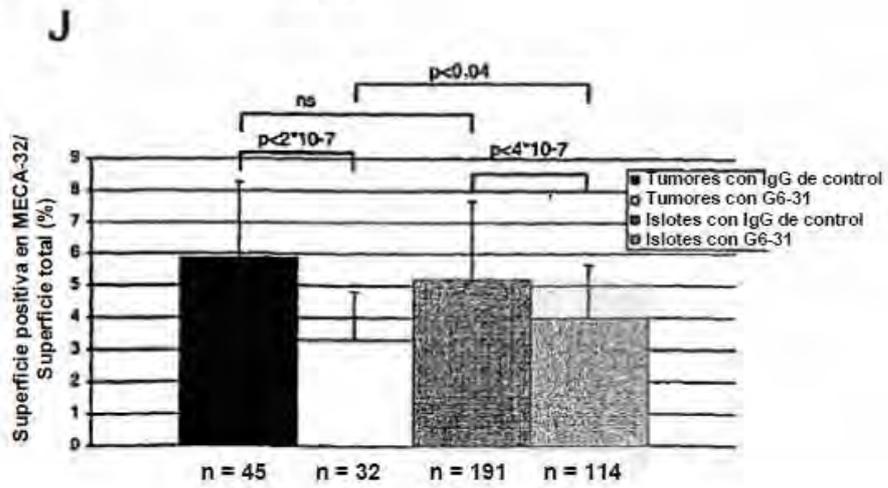
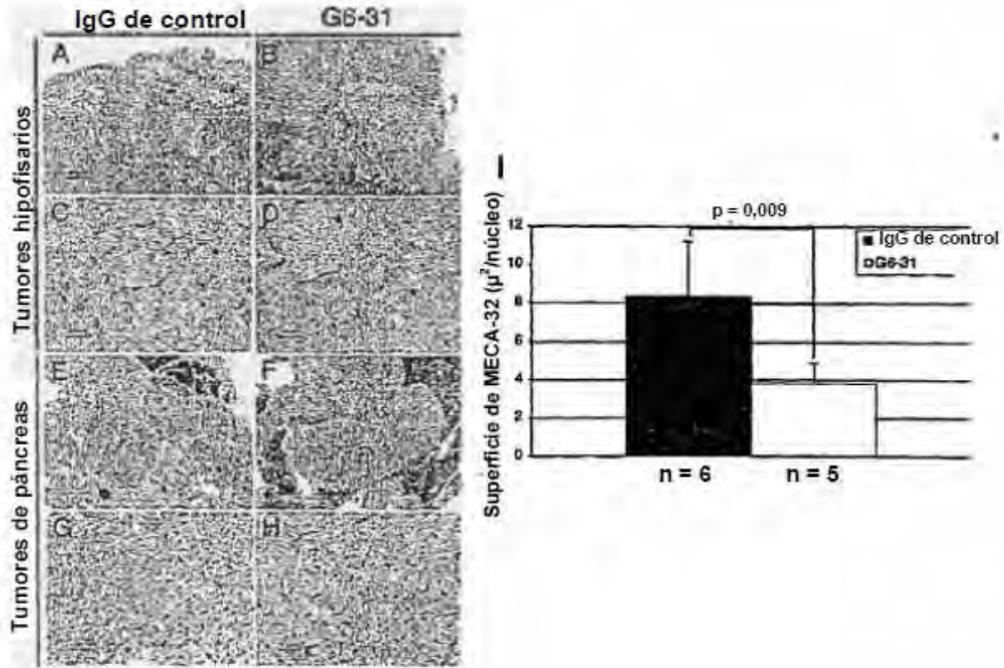


Figura 9



Figura 10

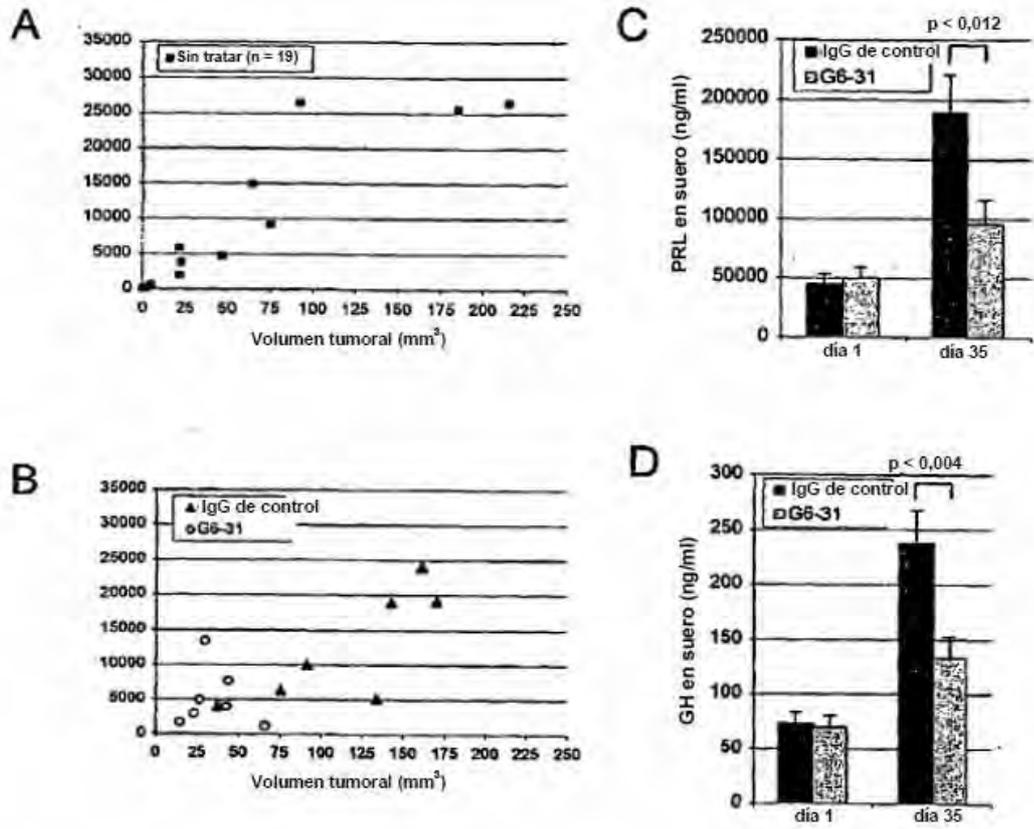


Figura 11

Tratamiento temprano ("intervención") (9-11 semanas)

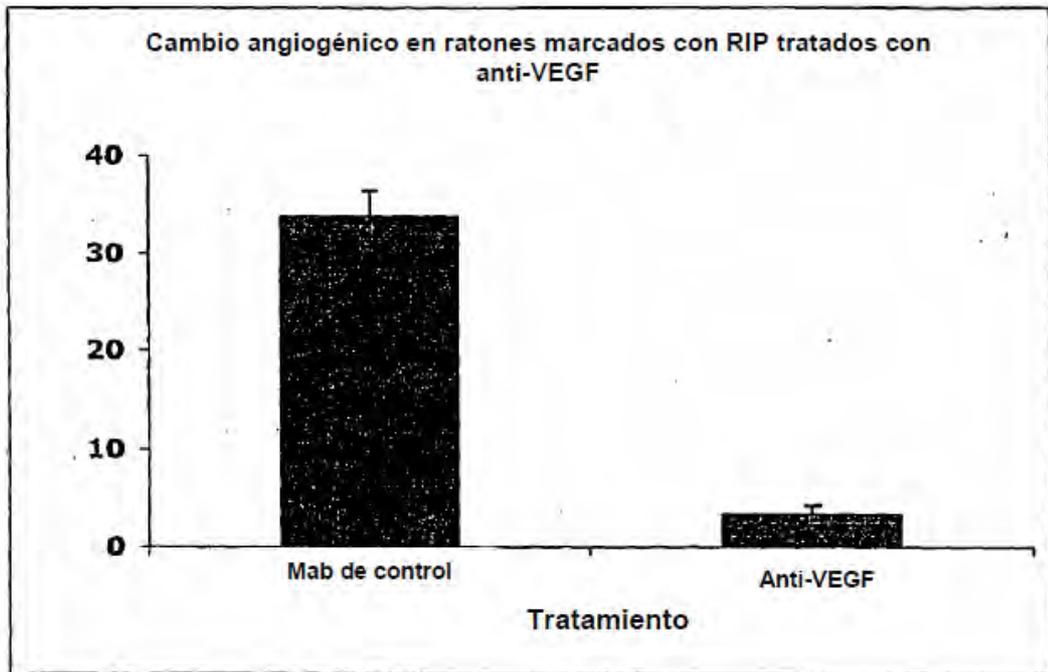


Figura 12A

Tratamiento tardío ("regresión") (11 semanas)

Carga tumoral

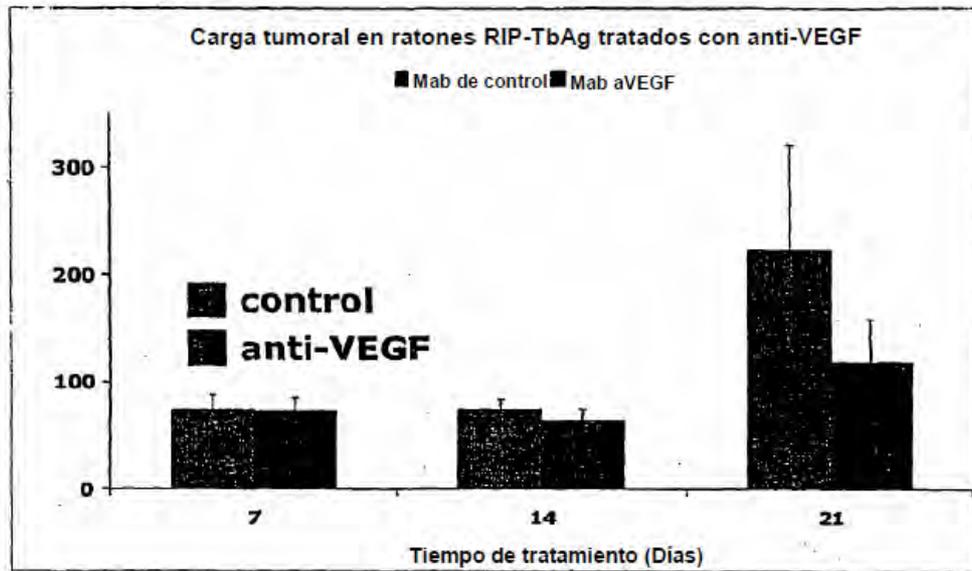


Figura 12B

Tratamiento de regresión (11 semanas)

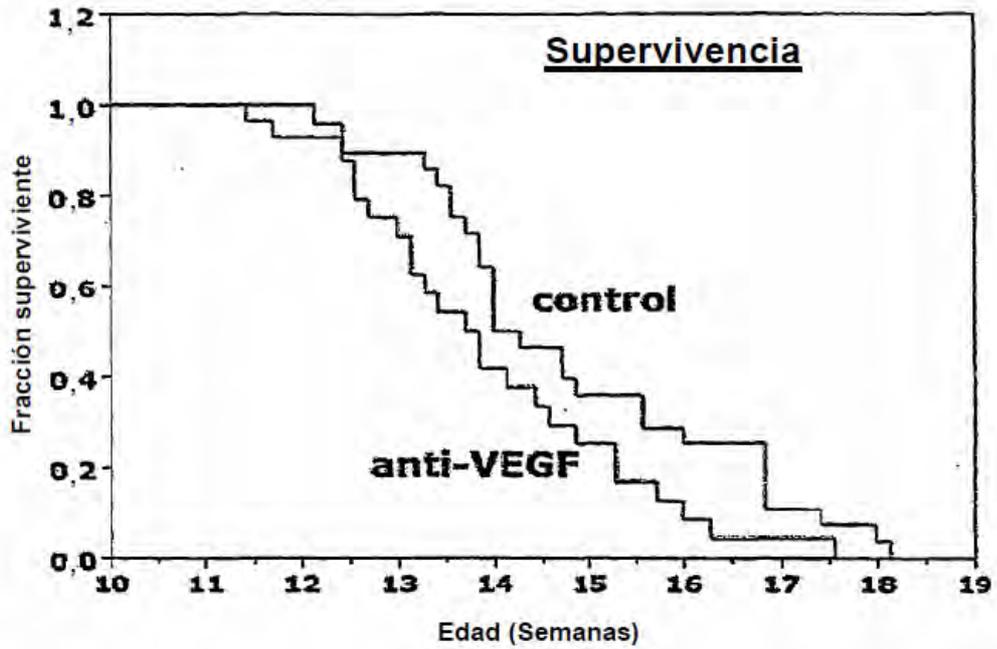


Figura 13

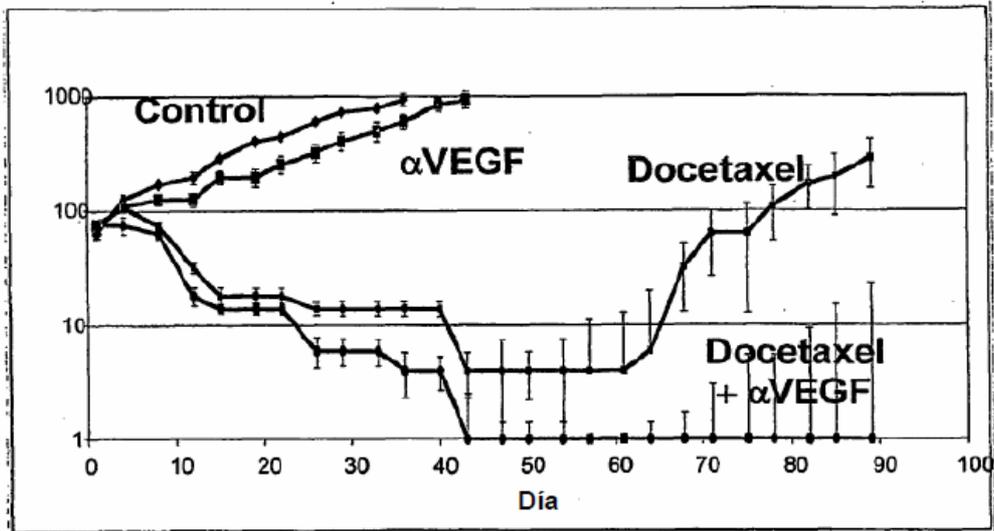


Figura 14

