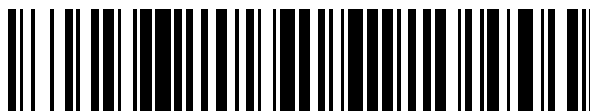


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 288**

51 Int. Cl.:

A01N 43/54 (2006.01)

A61K 31/425 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011** **E 16166917 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 3117709**

54 Título: **Terapia de combinación para tratar cáncer de mama**

30 Prioridad:

12.03.2010 US 313515 P

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

19.12.2018

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

HARPER, JAY;
LONNING, SCOTT MICHAEL y
HSU, FRANK JAMES

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 694 288 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación para tratar cáncer de mama

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estado Unidos 61/313.515, presentada el 12 de marzo de 2010.

Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones para tratar cáncer de mama. Específicamente, la invención se refiere a administrar un antagonista del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en combinación con uno o más agentes de quimioterapia para tratar cáncer de mama.

10 Antecedentes de la invención

15 La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta o TGF β) contiene muchas proteínas miembro que comparten elementos de secuencia y motivos estructurales comunes. Estas proteínas son conocidas por provocar un amplio espectro de respuestas biológicas en una variedad de tipos de células. La señalización celular desencadenada por los miembros de los miembros de la superfamilia del TGF β implica unión cooperativa del ligando a tanto componentes del receptor transmembrana tipo II como tipo III de TGF β , que induce el ensamblaje de un complejo de receptor de serina/treonina cinasa activo con el receptor tipo I de TGF β . Este complejo de receptor inicia una vía de transducción de señales fosforilando proteínas Smad citoplásmicas, que entonces se translocan al núcleo y actúan suprimiendo o activando la transcripción de genes diana.

20 Muchas proteínas de la superfamilia del TGF β tienen importantes funciones durante el desarrollo embrionario en la formación de patrones y especificación de tejido. La señalización inducida por las proteínas de la superfamilia del TGF β regula una variedad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, hematopoyesis y diferenciación de células epiteliales (para revisión véase Massague, 1987, Cell 49:437; Siegel et al., 2003, Nature Review Cancer, 8:807-20). En tejidos adultos, las proteínas de la superfamilia del TGF β también participan en procesos tales como el crecimiento y la metástasis tumoral, cicatrización, reparación ósea y remodelación ósea. Los efectos supresores de tumores de TGF β se han demostrado en estudios previos. Véase Derynck et al., 2001, Nat Genet, 29:117-129.

25 Las moléculas de antagonistas de TGF β regulan la señalización mediada por TGF β . Ejemplos de tales antagonistas incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra una o más isoformas de TGF β (patente de EE.UU. nº 5.571.714 y solicitud de patente PCT WO 97/13844).

30 Se encontró que las moléculas de antagonista de TGF β inhibían la tumorigenicidad de células de cáncer de mama y aumentaban la actividad de linfocitos citolíticos espontáneos de bazo de ratón. Véase Arteaga et al., 1993, J. Clin. Invest., 92:6.

Existe una necesidad de modalidades de terapia de combinación para tratar cáncer.

Sumario de la invención

35 La invención proporciona un método terapéutico de combinación para tratar cáncer de mama en un sujeto. El método incluye las etapas de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en combinación con capecitabina e ixabepilona. El uso del antagonista (TGF β) en combinación con capecitabina e ixabepilona potencia la eficacia de la combinación de capecitabina e ixabepilona para tratar un cáncer de mama.

40 En una realización, el antagonista de TGF β es una molécula que bloquea la unión de una proteína del TGF β a su receptor. En otra realización, el antagonista de TGF β es una molécula que es capaz de disminuir la actividad de un TGF β . En una realización particular, el antagonista de TGF β es un anticuerpo monoclonal anti-TGF β que se une a o neutraliza una o más isoformas de TGF β (por ejemplo, un anticuerpo anti-TGF β específico de pan).

45 En algunas realizaciones, el antagonista de TGF β se co-administra con una combinación de capecitabina e ixabepilona. En otras realizaciones, el antagonista de TGF β se administra independientemente de la administración de una combinación de capecitabina e ixabepilona.

La terapia de combinación de la invención inhibe el crecimiento de tumor primario y adicionalmente inhibe metástasis de tumor primario a pulmón.

50 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGF β , en la que el antagonista de TGF β está presente en una cantidad eficaz para potenciar la eficacia de la combinación de capecitabina e ixabepilona para tratar un cáncer de mama.

La invención proporciona además un kit que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGFβ, en el que el antagonista de TGFβ está presente en una cantidad eficaz para potenciar la eficacia de la combinación de capecitabina e ixabepilona para tratar un cáncer de mama.

- 5 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada, ejemplos y figuras. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solo, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra volúmenes medios del tumor primario. Se observó la inhibición del crecimiento tumoral en las cohortes de capecitabina, ixabepilona y capecitabina+ixabepilona en comparación con la cohorte de anticuerpo solo.

La Figura 2 muestra que 1D11 como agente único relativamente no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral de 4T1 (A). 1D11 mejoró la eficacia de capecitabina (B) pero no la eficacia de ixabepilona (C).

- 15 La Figura 3 muestra que la adición de 1D11 mejoró la eficacia de la terapia de combinación de capecitabina + ixabepilona en inhibir el crecimiento tumoral de 4T1 (A). La capecitabina inhibió el crecimiento tumoral de 4T1, pero no fue tan eficaz como la ixabepilona, aunque 1D11 mejoró la eficacia de la capecitabina, produciendo inhibición del crecimiento tumoral de 4T1 similar a aquella con ixabepilona sola (B). No hubo ventaja significativa de la terapia de combinación de capecitabina+ixabepilona con respecto a ixabepilona sola a menos que 1D11 también se incluyera en la terapia de combinación (C).

- 20 La Figura 4 muestra una visión general de los efectos de 1D11 como agente único o en combinación de capecitabina y/o ixabepilona sobre el crecimiento tumoral de 4T1. La terapia más eficaz es la combinación triple de 1D11+capecitabina+ixabepilona.

La Figura 5 muestra la curva de supervivencia para animales. La mediana de la supervivencia más larga se observó en los animales tratados con 1D11 + capecitabina + ixabepilona.

- 25 La Figura 6 muestra que el tiempo necesario para alcanzar el punto final de un volumen de tumor primario de $\geq 2000 \text{ mm}^3$ es significativamente diferente ($p < 0,0001$) entre grupos de tratamiento. 1D11 aumentó el tiempo hasta el punto final debido a la terapia con capecitabina y el tiempo más largo hasta el punto final se logró en el grupo de 1D11+capecitabina+ixabepilona.

- 30 La Figura 7 muestra el número total de metástasis de pulmón a través de todos los grupos de tratamiento (A) y el número total de metástasis de pulmón $> 1 \text{ mm}$ de tamaño a través de todos los grupos de tratamiento (B). El mayor número de metástasis de pulmón en cada cohorte era el grupo de tratamiento con el tiempo más largo hasta el punto final; el grupo de tratamiento con 1D11 en cada caso.

- 35 La Figura 8 muestra el número de metástasis de pulmón en la cohorte de agente individual (A), la cohorte de capecitabina (B), la cohorte de ixabepilona (C) y la cohorte de capecitabina+ixabepilona (D). En cada cohorte, el mayor número de metástasis de pulmón se observó en el grupo de tratamiento con 1D11, probablemente debido a que estos grupos de tratamiento estuvieron en el estudio más tiempo que sus controles respectivos dentro de cada cohorte.

La Figura 9 muestra que hubo una correlación entre el número de metástasis de pulmón y el tiempo en el estudio, independientemente del tratamiento.

- 40 La Figura 10 muestra volúmenes medios del tumor primario. La inhibición del crecimiento tumoral se observó en las cohortes de capecitabina, ixabepilona, y de capecitabina+ixabepilona en comparación con la cohorte de anticuerpo solo.

- 45 La Figura 11 muestra que el tratamiento con 1D11 tuvo ligeros efectos como agente único o en combinación con tanto capecitabina como ixabepilona. A. la terapia con agente individual con 1D11 produjo una reducción significativa en el tamaño del tumor primario. B. 1D11, administrado en combinación con capecitabina, produjo eficacia mejorada por encima de la de la capecitabina sola. C. 1D11 no mejoró la eficacia de la ixabepilona en una manera estadísticamente significativa. (A: * = $p < 0,05$, prueba de comparaciones múltiples de Tukey) (B: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, prueba de la T).

- 50 La Figura 12 muestra que la terapia con 1D11 mejoró significativamente la eficacia de la combinación de ixabepilona/capecitabina contra el volumen de tumor primario. A. 1D11 mejoró la eficacia de ixabepilona y capecitabina cuando se comparó con 13C4 combinado con ixabepilona y capecitabina. B. Ixabepilona mejoró significativamente la eficacia de 1D11 y capecitabina cuando se dosificaron juntos. C. La combinación triple de 1D11, capecitabina e ixabepilona fue más eficaz que 1D11 + ixabepilona. (A: * = $p < 0,05$, prueba de la T) (B: *** = $p < 0,001$, ANOVA unilateral) (C: * = $p < 0,05$, prueba de la T).

La Figura 13 muestra una visión general de los efectos de 1D11 como agente único o en combinación con capecitabina y/o ixabepilona sobre el crecimiento tumoral de 4T1. La terapia más eficaz es la combinación triple de 1D11+capecitabina+ixabepilona.

5 La Figura 14 muestra metástasis de pulmón totales. 1D11 no inhibió el número de metástasis al pulmón ni mejoró la eficacia de quimioterapéuticos.

La Figura 15 muestra el esquema de selección de células CD11b⁺ aisladas de tumores primarios 4T1. (A) Selección por FSC hi de células basada en el tamaño y la dispersión. (B) Live gate (dim, 52 %) de células viables mediante la selección por FSC hi. (C) Selección de MDSCs (Gr-1 PE bright CD11b PerCP Cy5.5 bright, 74,1 %) y macrófagos (Gr-1 PE dim y CD11b PerCP Cy5.5 bright, 15,4 %) mediante live gate. (D) Selección de macrófagos M1 (F4/80 bright y CD206 Alexa 488 dim, 83 %) y macrófagos M2 (F4/80 bright y CD206 Alexa 488 bright, 15,7 %) seleccionados mediante macrófagos. (E) Confirmación del estado CD206 negativo/bajo de MDC seleccionados mediante Gr-1⁺CD11b⁺.

15 La Figura 16 muestra volúmenes medios del tumor primario. Se observó inhibición del crecimiento tumoral en las cohortes de capecitabina, ixabepilona y de capecitabina+ixabepilona en comparación con la cohorte de anticuerpo solo.

La Figura 17 muestra que 1D11 como agente único no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral de 4T1 (A). 1D11 tampoco mejoró significativamente la eficacia de capecitabina (B) o ixabepilona (C).

20 La Figura 18 muestra que 1D11 mejoró la eficacia de la terapia de combinación de capecitabina + ixabepilona en inhibir el crecimiento tumoral de 4T1 (A). La capecitabina inhibió el crecimiento tumoral de 4T1 ligeramente, pero fue más eficaz cuando se combinó con ixabepilona (B). La inhibición del crecimiento tumoral entre ixabepilona y la terapia de combinación de capecitabina+ixabepilona fue similar, a menos que 1D11 también se incluyera en la terapia de combinación (C).

25 La Figura 19 muestra una visión general de los efectos de 1D11 como agente único o en combinación con capecitabina y/o ixabepilona sobre el crecimiento tumoral de 4T1. La terapia más eficaz es la combinación triple de 1D11+capecitabina+ixabepilona.

La Figura 20 muestra que las metástasis pulmonares de ratones portadores de tumores 4T1 SQ disminuyeron por la terapia de combinación de capecitabina + ixabepilona y la eficacia de este tratamiento mejoró significativamente mediante la adición de 1D11.

30 La Figura 21 muestra que basándose en inmunofenotipificación de macrófagos totales (F4/80⁺), macrófagos M1 (F4/80⁺CD206⁻) y macrófagos M2 (F4/80⁺CD206⁺) aislados de tumores primarios 4T1 en el estudio 09-4255, 1D11 tuvo poco efecto sobre el número de macrófagos en tumores primarios. La barra en negro representa vehículo; la barra en rojo representa 13C4 (control); y la barra en azul representa 1D11.

La Figura 22 muestra que la arginasa de células CD11b⁺ aisladas de tumores primarios 4T1 de ratones tratados con 1D11 disminuye significativamente en comparación con ratones de control.

35 1D11 descrito en el presente documento representa un anticuerpo monoclonal anti-TGFβ.

Descripción detallada de la invención

40 La invención se refiere a composiciones y métodos de tratamiento de un cáncer de mama. Específicamente, la invención se refiere a administrar un antagonista de TGFβ en combinación con uno o más agentes de quimioterapia para tratar un cáncer de mama. El uso de antagonista de TGFβ en combinación con uno o más agentes de quimioterapia potencia la eficacia del uno o más agentes de quimioterapia para tratar un cáncer de mama.

Los agentes de quimioterapia de la invención incluyen, pero no se limitan a, capecitabina, ixabepilona, o una combinación de las mismas.

45 En una realización, en el presente documento se proporciona un método para potenciar la eficacia de una quimioterapia para tratar un cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método: administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGFβ en combinación con capecitabina e ixabepilona, en el que la administración de dicho antagonista de TGFβ potencia la eficacia de capecitabina e ixabepilona para tratar dicho cáncer de mama.

50 En otra realización, en el presente documento se proporciona un método de inhibición de un crecimiento tumoral asociado a cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método: administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGFβ en combinación con capecitabina e ixabepilona, en el que la administración de dicho antagonista de TGFβ potencia la eficacia de capecitabina e ixabepilona para inhibir dicho crecimiento tumoral asociado a cáncer de mama.

Los inventores de la presente solicitud encontraron sorprendente e inesperadamente que la neutralización de TGFβ en combinación con uno o más agentes de quimioterapia potencia la eficacia del uno o más agentes de quimioterapia para tratar un cáncer de mama. Por ejemplo, el uso de antagonista de TGFβ en combinación con capecitabina e ixabepilona potencia sorprendente e inesperadamente la eficacia de capecitabina e ixabepilona para tratar un cáncer de mama.

Como se usa en el presente documento, "TGFβ" se refiere a todas las isoformas de TGFβ. Actualmente hay 5 isoformas conocidas de TGFβ (1-5), todas las cuales son homólogas (60-80 % de identidad) y todas las cuales forman homodímeros de aproximadamente 25 kD, y actúan en receptores celulares de TGFβ comunes (tipos I, II y III). La biología genética y molecular de TGFβ es muy conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, Roberts, 1998, Miner. Electrolyte and Metab., 24(2-3):111-119; Wrana, 1998, Miner. Electrolyte and Metab., 24(2-3):120-130.)

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de TGFβ" es cualquier molécula que es capaz de disminuir la cantidad o actividad de TGFβ, tanto dentro de una célula como dentro de un sistema fisiológico. Preferentemente, el antagonista de TGFβ actúa reduciendo la cantidad o actividad de un TGFβ 1, 2 o 3. Por ejemplo, un antagonista de TGFβ puede ser una molécula que inhibe la expresión de TGFβ al nivel de la transcripción, traducción, procesamiento o transporte; puede afectar la estabilidad de TGFβ o la conversión de la molécula precursora a la forma madura activa; puede afectar la neutralización de TGFβ o la capacidad de TGFβ para unirse a uno o más receptores celulares (por ejemplo, tipo I, II o III); o puede interferir con la señalización de TGFβ.

Se conocen en la técnica una variedad de antagonistas de TGFβ y métodos para su producción y muchos más están actualmente en desarrollo (véase, por ejemplo, Dennis et al., patente de EE.UU. N.º 5.821.227). El antagonista de TGFβ específico empleado no es una característica limitante; cualquier antagonista de TGFβ eficaz como se define en el presente documento puede ser útil en los métodos y composiciones de la presente invención. En una realización, el antagonista de TGFβ es un antagonista de TGFβ-1, TGFβ-2 o TGFβ-3. En una realización particular, el antagonista de TGFβ es un anticuerpo anti-TGFβ específico de pan que se une a o neutraliza una o más isoformas de TGFβ.

Los efectos de TGFβ están mediados por la unión de TGFβ activo a receptores específicos presentes en las células, seguido de transducción de señal a aquellas células. Los antagonistas de TGFβ se definen como agentes que inhiben la transducción de señales de TGFβ, que incluyen antagonistas de TGFβ que se conocen en la técnica. Por ejemplo, agentes que se unen a TGFβ y previenen que TGFβ se una a un receptor de TGFβ actuarán de antagonistas de TGFβ.

Otros ejemplos no limitantes incluyen anticuerpos bloqueantes (neutralizantes) específicos para un TGFβ humano (NABs) tal como aquellos descrito por Dasch et al. (J. Immunol. (1989) 142:1536) y Lucas et al. (J. Immunol. (1990) 145:1415), receptores de TGFβ solubles, receptores de TGFβ unidos a la membrana, inhibidores de la proteasa que inactivan una proteasa responsable de activar un TGFβ precursor en TGFβ maduro, anticuerpos específicos para receptores de TGFβ (tipos I, II o III) y que previenen la unión de TGFβ al receptor, y combinaciones de los mismos.

Aquellos expertos en la materia reconocen diversas formas en las que un anticuerpo derivado de una especie, por ejemplo, un ratón, puede manipularse con el fin de ser terapéuticamente útil en una segunda especie, por ejemplo, un ser humano. Ciertas de estas técnicas se revisan brevemente en Harris y Emery, TIBTECH 11:42-44, 1993.

El TGFβ es generalmente secretado como un precursor latente que consiste en TGFβ no covalentemente asociado a una proteína designada proteína asociada a latencia (LAP; revisada en Harpel et al. (1992) Prog. Growth Factor Res. 4: 321). Se ha expresado un ADN que codifica un péptido de 278 aminoácidos correspondiente a pre-pro-TGFβ, que termina justo antes de la forma madura de TGFβ y que contiene una sustitución de Cys33 a Ser33 (Derynck et al. (1985) Nature 316: 701), y se ha encontrado que se une a TGFβ y lo convierte en latente.

Formas solubles de receptores de TGFβ también se unirán a TGFβ y prevendrán la unión a receptores de TGFβ asociados a la membrana. Los receptores de TGFβ se describen por Wang et al. (Cell (1991) 67: 797) y Lin et al. (Cell (1992) 68: 775). Pueden prepararse formas solubles de receptores de TGFβ por métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse mutantes de delección que carecen del dominio transmembrana de un receptor de TGFβ, que expresarán una proteína de unión a TGFβ soluble. Miyazono et al. (Adv. Immunol. (1994) 55: 181) han revisado receptores de TGFβ

También se conocen en la técnica otros tipos de antagonistas de TGFβ. Por ejemplo, Yamaguchi et al. (Nature (1990) 346: 281) tratan la decorina, un proteoglicano pequeño de condroitina-sulfato de dermatano que se une a TGFβ y modula la actividad de este factor de crecimiento. Ohtsuki y Massague (Mol. Cell. Biol. 12:261-265, 1992) desvelan inhibidores de proteínas cinasas que bloquean ciertas actividades biológicas de TGFβ. *T. cruzi* produce una cisteína proteasa (cruzaína o cruzipaina; Eakin et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 7411) que convierte el precursor de TGFβ inactivo en TGFβ maduro activo. El diseño y el uso de inhibidores de la proteasa como fármacos es muy conocido en la técnica (Design of Enzyme Inhibitors as Drugs; Sandier and Smith, eds; 1989, Oxford University Press; Proteinase Inhibitors Medical and Biological Aspects; Katunuma, Umezawa and Holzer, eds., 1983, Springer-Verlag); así, pueden prepararse inhibidores de cruzaína y serán útiles como antagonistas de TGFβ.

Todavía otros antagonistas de TGF β y métodos para su producción son muy conocidos en la técnica, con muchos más actualmente en desarrollo. El antagonista de TGF β específico empleado no es una característica limitante, ya que cualquier antagonista de TGF β eficaz puede ser útil en los métodos de la presente invención. Ejemplos de tales antagonistas incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra una o más isoformas de TGF β (patente de EE.UU. N.º 5.571.714), receptores de TGF β , fragmentos de los mismos, derivados de los mismos y anticuerpos dirigidos contra receptores de TGF β (patentes de EE.UU. N.º 5.693.607, 6.008.011, 6.001.969 y 6.010.872); péptido asociado a latencia (documento WO 91/08291), TGF β latente grande (documento WO 94/09812), fetuina (patente de EE.UU. N.º 5.821.227), decorina y otros proteoglicanos tales como biglicano, fibromodulina, lumicano y endogлина (patentes de EE.UU. N.º 5.583.103, 5.654.270, 5.705.609, 5.726.149, 5.824.655, 5.830.847, y 6.015.693).

Otros ejemplos de tales antagonistas incluyen somatostatina (solicitud de patente PCT WO 98/08529), manosa-6-fosfato o manosa-1-fosfato (patente de EE.UU. N.º 5.520.926), prolactina (solicitud de patente PCT WO 97/40848), factor de crecimiento similar a la insulina II (solicitud de patente PCT WO 98/17304), IP-10 (solicitud de patente PCT WO97/00691), péptidos que contienen arg-gly-asg (patente de EE.UU. N.º 5.958.411 y solicitud de patente PCT WO 93/10808 y), extractos de plantas, hongos y bacteria (solicitud de patente europea 813875, solicitud de patente japonesa 8119984 y patente de EE.UU. N.º 5.693.610), oligonucleótidos antisentido (patentes de EE.UU. N.º 5.683.988, 5.772.995, 5.821.234 y 5.869.462 y solicitud de patente PCT WO 94/25588), y un huésped de otras proteínas implicado en la señalización de TGF β , que incluyen SMAD y MAD (patentes de EE.UU. N.º 5.834.248, 5.807.708 y 5.948.639) y Ski y Sno (G. Vogel, Science, 286:665 (1999) y Stroschein et al., Science, 286:771-74 (1999)) y fragmentos de cualquiera de las moléculas anteriores que retienen la capacidad de inhibir la actividad de TGF β .

Los receptores de TGF β y fragmentos de unión a TGF β de receptores de TGF β , especialmente fragmentos solubles, son antagonistas de TGF β útiles en los métodos de la presente invención. Los receptores de TGF β y los ácidos nucleicos que los codifica son muy conocidos en la técnica. La secuencia de ácidos nucleicos humana que codifica el receptor de TGF β tipo 1 se desvela, por ejemplo, en Número de acceso de GenBank L15436 y en la patente de EE.UU. N.º 5.538.892 de Donahoe et al. La secuencia de ácidos nucleicos humana del receptor de TGF β tipo 2 está públicamente disponible, por ejemplo, con los Números de acceso de GenBank AW236001; AI35790; AI279872; AI074706; y AA808255. La secuencia de ácidos nucleicos humana del receptor de TGF β tipo 3 también está públicamente disponible, por ejemplo, con los números de acceso de GenBank NM 003243; AI887852; AI817295; y AI681599.

En una realización preferida, el antagonista de TGF β es un anticuerpo que bloquea la unión de TGF β a su receptor, o fragmentos del mismo, tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios y otras formas de "anticuerpos" que retienen la capacidad para unirse a TGF β . En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TGF β específico de pan. En un ejemplo, el anticuerpo anti-TGF β específico de pan se une a y neutraliza una o más isoformas de TGF β . En otro ejemplo, el anticuerpo anti-TGF β específico de pan bloquea o inhibe la unión de una proteína a una o más isoformas de TGF β .

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización particular, el anticuerpo es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal murino 1D11, depositado con el número de ATCC [.....]. En otra realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TGF β descrito en la solicitud de patente de EE.UU. número 11/350.906, presentada el 8 de febrero de 2006 (documento U.S. 2006/0251658), que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad. En otra realización particular, el anticuerpo comprende una o más CDR de 1D11 descritas en la solicitud de patente de EE.UU. número 11/350.906.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina intactas que comprenden 4 cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada contiene tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento VL) y una región constante de la cadena ligera. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Las regiones variables de las cadenas ligeras kappa se denominan en el presente documento VK. La expresión VL, como se usa en el presente documento, pretende incluir tanto las regiones variables de las cadenas ligeras tipo kappa (VK) como de las cadenas ligeras tipo lambda. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL incluyen regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. "CDRH1" se refiere a la primera región CDR en una cadena pesada del anticuerpo, "CDRH2" se refiere a la segunda región CDR en una cadena pesada del anticuerpo, y "CDRH3" se refiere a la tercera región CDR en una cadena pesada del anticuerpo. "CDRL1" se refiere a la primera

región CDR en una cadena ligera del anticuerpo, "CDRL2" se refiere a la segunda región CDR en una cadena ligera del anticuerpo, y "CDRL3" se refiere a la tercera región CDR en una cadena ligera del anticuerpo.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clases. Hay 5 clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varios de éstos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se llaman alfa (α), delta (Δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. La presente invención incluye anticuerpos de cualquiera de las clases anteriormente mencionadas o subclases (isotipos).

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también pretende englobar anticuerpos intactos, fragmentos funcionales que se unen al antígeno, y variantes de los mismos que se unen al antígeno, que incluyen miméticos de anticuerpos o que comprende porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o porción del mismo; conteniendo cada uno al menos una CDR. Los anticuerpos de la invención incluyen fragmentos de anticuerpos o variantes que tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones CDR.

Los fragmentos de anticuerpos que están englobados por la presente invención incluyen Fab (por ejemplo, por digestión con papaína), Fab', F(ab')₂, facb (por ejemplo, por digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, por digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, por digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), sVds, y Fv o scFv (por ejemplo, por técnicas de biología molecular). Los fragmentos de anticuerpos también pretenden incluir anticuerpos de dominios delecionados, diacuerpos, triacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarias (incluyendo anticuerpos camelizados), y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie (por ejemplo, ratón o rata) o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada. Así, la presente invención incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos que comprenden una cadena pesada quimérica y/o una cadena ligera quimérica. La cadena pesada quimérica puede comprender cualquiera de las regiones variables (VH) de la cadena pesada descritas en el presente documento o mutantes o variantes de las mismas fusionadas con una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo no humano. La cadena ligera quimérica puede comprender cualquiera de las regiones variables (VL) de la cadena ligera descritas en el presente documento o mutantes o variantes de las mismas fusionadas con una región constante de la cadena ligera de un anticuerpo no humano.

Los anticuerpos de la invención también incluyen "anticuerpos humanizados", que son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los residuos de la región estructural en las regiones estructurales humanas estarán sustituidos con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, o mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región estructural son identificadas por técnicas convencionales tales como por modelado de las interacciones de la CDR y los residuos de la región estructural para identificar residuos de la región estructural importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de la región estructural poco usuales en posiciones particulares. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas que incluyen injerto, inactivación o remodelación superficial de CDR, y barajado de cadenas.

El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes correspondientes a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR. El anticuerpo humano puede tener al menos una posición sustituida con un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de aminoácido potenciador de la actividad que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, se han injertado sobre secuencias de la región estructural humana.

La expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal que es transgénico para genes de la inmunoglobulina humana, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme

de secuencias de genes de la inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

5 El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son sustancialmente idénticos, excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural o variaciones post-traduccionales menores que pueden estar presentes. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico (también conocido como determinante o epítope). Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, cada anticuerpo monoclonal se dirige a un único determinante sobre el antígeno. El adjetivo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular.

15 Los anticuerpos también incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente similares a la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de la cadena pesada y/o ligera. Sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos se define en el presente documento como una secuencia con al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o el 99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos comparada, como se ha determinado por el método de búsqueda FASTA según Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 (1988).

20 Los anticuerpos de la invención incluyen aquellos que son idénticos a aquellos descritos en el presente documento, excepto por una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. Sustitución de aminoácidos conservativa se define como un cambio en la composición de aminoácidos mediante el cambio de uno o dos aminoácidos de un péptido, polipéptido o proteína, o fragmento de los mismos. La sustitución es de aminoácidos con propiedades generalmente similares (por ejemplo, ácido, básico, aromático, tamaño, positivamente o negativamente cargado, polaridad, no polaridad) de forma que las sustituciones no alteren sustancialmente las características del péptido, polipéptido o proteína (por ejemplo, carga, punto isoelectrico, afinidad, avidez, conformación, solubilidad) o actividad. Sustituciones típicas que pueden realizarse para tal sustitución de aminoácidos conservativa puede ser entre los siguientes grupos de aminoácidos: glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L) y isoleucina (I); ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E); alanina (A), serina (S) y treonina (T); histidina (H), lisina (K) y arginina (R); asparagina (N) y glutamina (Q); fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden hacerse en las CDR o regiones estructurales, por ejemplo, regiones que flanquean las regiones hipervariables principalmente responsables de las características de unión selectiva y/o específica de la molécula, además de otras partes de la molécula, por ejemplo, casete variable de la cadena pesada.

35 Los anticuerpos de la presente invención también incluyen aquellos que tienen su afinidad elevada o alterada por mutación directa, maduración por afinidad, presentación en fagos, o barajado de cadenas. La afinidad y especificidad pueden modificarse o mejorarse mutando CDR y/o residuos de la región estructural y buscando sitios de unión al antígeno que tienen las características deseadas. Una forma es aleatorizar residuos individuales o combinaciones de residuos de manera que, en una población de sitios de unión al antígeno de otro modo idénticos, subconjuntos de dos a veinte aminoácidos se encuentren en posiciones particulares. Alternativamente, pueden inducirse mutaciones en una variedad de residuos por error usando métodos de PCR. En otro ejemplo, vectores de presentación en fagos que contienen genes de la región variable de la cadena pesada y ligera pueden propagarse en cepas mutadas de *E. coli*.

45 Los anticuerpos preparados por barajado de cadenas incluyen aquellos en los que la cadena pesada o ligera está aleatoriamente emparejada con otras cadenas pesadas o ligeras descritas en el presente documento. Así, los anticuerpos de la invención incluyen cualquier combinación de cadenas pesadas y ligeras (tanto de longitud completa como porciones de las mismas).

Los anticuerpos de la presente invención son específicos para TGF β . Especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo por un epítope particular de un antígeno. Los anticuerpos pueden presentar tanto selectividad por especie como por molécula, o pueden ser selectivos con respecto a molécula solo y unirse a TGF β de más de una especie. Los anticuerpos de la invención pueden unirse a TGF β humano, murino, de rata, perro y/o de conejo. En una realización, el anticuerpo se une a TGF β humano. Si un anticuerpo se une específicamente a un TGF β puede determinarse, por ejemplo, por un ensayo de unión tal como un ELISA, empleando un panel de antígenos.

55 La especificidad de los anticuerpos puede determinarse basándose en afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo (K_d), mide la intensidad de la unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión al anticuerpo. La avidez es la medida de la intensidad de la unión entre un anticuerpo con su antígeno. La avidez está relacionada con tanto la afinidad entre un epítope con su sitio de unión al antígeno sobre el anticuerpo como la valencia del anticuerpo, que se refiere al número de sitios

de unión al antígeno de un epítipo particular. Los anticuerpos normalmente se unen con una constante de disociación (K_d) de aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-11} litros/mol (por ejemplo, $K_D < 100$ nM). Cualquier K_d inferior a aproximadamente 10^{-4} litros/mol se considera generalmente que indica unión no específica. Cuanto menor sea el valor de K_d , más fuerte será la intensidad de unión entre un determinante antigénico y el sitio de unión al anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención se unen a TGF β con una K_d de preferentemente aproximadamente 1×10^{-8} M $^{-1}$ o menos, más preferentemente aproximadamente 1×10^{-9} M $^{-1}$ o menos, más preferentemente aproximadamente 1×10^{-10} M $^{-1}$ o menos, y lo más preferentemente aproximadamente 1×10^{-11} M $^{-1}$ o menos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multispecíficos. Los anticuerpos monoespecíficos se unen a solo un antígeno. Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen dos especificidades de unión a antígeno diferentes o sitios. Los anticuerpos multispecíficos tienen más de dos especificidades de unión a antígeno diferentes o sitios. Si un anticuerpo tiene más de una especificidad, los epítopos reconocidos pueden asociarse a un único antígeno o a más de un antígeno.

En otro aspecto de la invención, el anticuerpo se conjuga con otro resto, tanto directamente como indirectamente. La conjugación puede ser química o biosintética. Otros restos que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen toxinas, agentes antitumorales, marcas detectables, restos diana y restos indicadores. Toxinas adecuadas se describen en el presente documento.

En una realización, uno o más agentes de quimioterapia de la invención están operativamente ligados al anticuerpo. Por ejemplo, capecitabina, ixabepilona, o ambas, pueden conjugarse con el anticuerpo anti-TGF β .

Los anticuerpos que están conjugados con marcas detectables pueden usarse, por ejemplo, para diagnosticar una enfermedad, para ayudar en el pronóstico y para localizar células tumorales, *in vivo* o *in vitro*. La marca detectable produce una señal medible que es detectable por medios externos. Las marcas detectables incluyen una enzima, un cromóforo, un radioisótopo, o una sustancia que emite luz por fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y acetilcolinesterasa.

Los cromóforos incluyen colorantes que absorben luz en la región ultravioleta o visible, y pueden ser sustratos o productos de degradación de reacciones catalizadas por enzima. Materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Materiales de quimioluminiscencia adecuados incluyen luminol, luciferasa, luciferina y aecurina. Materiales radiactivos adecuados incluyen 125I, 131I, 35S y 3H.

Los restos diana son los primeros miembros de los pares de unión. Los agentes antitumorales, por ejemplo, pueden conjugarse con segundos miembros de tales pares y así se dirigen al sitio en el que la proteína de unión al antígeno está unida. Un ejemplo común de un par de unión tal es avidina y biotina. La biotina puede conjugarse con un anticuerpo de la invención, proporcionando así una diana para un agente antitumoral u otro resto que está conjugado con la avidina o la estreptavidina. Alternativamente, la biotina u otro resto tal está ligado a una proteína de unión al antígeno de la invención y se usa como indicador, por ejemplo, una marca detectable se conjuga con avidina o estreptavidina.

La presente invención también incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-TGF β o porción del mismo. Los ácidos nucleicos pueden codificar una cadena pesada del anticuerpo, que comprende una cualquiera de las regiones VH o una porción de las mismas, o una cualquiera de las CDR VH, que incluyen cualquier variante de las mismas, como se desvela en el presente documento. La invención también incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican una cadena ligera del anticuerpo que comprende una cualquiera de las regiones VL o una porción de las mismas o una cualquiera de las CDR VL, que incluyen cualquier variante de las mismas, como se desvela en el presente documento. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico codifica tanto una cadena pesada como ligera, o porciones de las mismas.

La invención también incluye vectores recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento. El vector puede comprender un ácido nucleico que codifica solo una cadena del anticuerpo o una porción de la misma (por ejemplo, la cadena pesada o ligera) o un ácido nucleico que codifica ambas cadenas del anticuerpo o porciones de las mismas.

Vectores a modo de ejemplo incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, virus y ácidos nucleicos de fago u otras moléculas de ácidos nucleicos que son capaces de replicación en un huésped procariota o eucariota. Los vectores normalmente contienen un marcador para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de huéspedes transformados tales como conferir resistencia a antibióticos tales como ampicilina o neomicina

El vector puede ser un vector de expresión, en el que el ácido nucleico que codifica el anticuerpo está operativamente ligado a una secuencia de control de la expresión. Vectores de expresión típicos contienen terminadores de la transcripción y de la traducción, secuencias de iniciación, y promotores útiles para la regulación de la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Los vectores también pueden contener casetes de expresión genética que contiene una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del vector en tanto eucariotas como procariotas, es decir, vectores lanzadera y marcadores de selección

para tanto sistemas procariotas como eucariotas. Cuando el vector contiene ácidos nucleicos que codifican tanto una cadena pesada como ligera o porciones de la misma, el ácido nucleico que codifica la cadena pesada puede estar bajo el mismo promotor o un promotor separado. Los promotores separados pueden ser idénticos o pueden ser tipos diferentes de promotores.

Promotores adecuados incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles. Secuencias/promotores de control de la expresión representativos incluyen el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, regiones promotoras y operadoras importantes del fago lambda, la región de control de proteína de la envuelta *fd*, los promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo, un promotor para 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de fosfatasa ácida de levadura, por ejemplo, *Pho5*, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura, promotores derivados del citomegalovirus humano, promotor de metalotionina, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina y promotores derivados de poliovirus, adenovirus, retrovirus, y virus simio, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del SV40.

La invención también incluye huéspedes no humanos tales como células u organismos que contienen una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención. Por "huésped" se indica un organismo unicelular o multicelular no humano o una "célula huésped", que se refiere a una célula o población de células en la que una molécula de ácido nucleico o vector de la invención se introduce. "Una población de células huésped" se refiere a un grupo de células cultivadas en el que una molécula de ácido nucleico o vector de la presente invención puede introducirse y expresarse. El huésped contiene un ácido nucleico o vector que codifica solo una cadena o porción de la misma (por ejemplo, la cadena pesada o ligera); o puede contener un ácido nucleico o vector que codifica ambas cadenas o porciones de las mismas, tanto los mismos ácidos nucleicos y/o vectores como separados.

Un huésped de la presente invención puede ser procariota o eucariota. Huéspedes procariotas adecuados incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tal como SG-936 de *E. coli*, HB 101 de *E. coli*, W3110 de *E. coli*, X1776 de *E. coli*, X2282 de *E. coli*, DHI de *E. coli* y MRC1 de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis*, y *Streptomyces*. Células eucariotas adecuadas incluyen levadura y otros hongos, células de insecto, células vegetales, células humanas y células de animales, que incluyen células de mamífero, tales como líneas de hibridoma, células COS, células NS0 y células CHO.

La invención también incluye métodos de producción de un anticuerpo de la presente invención, que implican cultivar una célula huésped que expresa una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención, y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se purifica separándolo del medio de cultivo. Los anticuerpos que comprenden más de una cadena pueden producirse expresando cada cadena junta en el mismo huésped; o como cadenas separadas, que se ensamblan antes o después de la recuperación del medio de cultivo.

Métodos de preparación de otros antagonistas de TGFβ son muy conocidos en la técnica, como se ha descrito anteriormente.

La capecitabina se desveló generalmente en la patente de EE.UU. N.º 4.966.891 y se desveló específicamente en la patente de EE.UU. N.º 5.472.949. En composiciones farmacéuticas se comercializa bajo el nombre de marca XELODA por Roche Laboratories Inc. (EE.UU.). Se conocen en el estado de la técnica diversos procesos sintéticos que conducen a la capecitabina, por ejemplo, se describen métodos de preparación de la capecitabina en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20080300399, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

Los métodos de preparación de la ixabepilona también son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la perla recubierta entérica que comprende ixabepilona, y la preparación y administración de la misma, se describen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20060153917, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

En otra realización, en el presente documento se proporciona una composición farmacéutica para tratar un cáncer de mama en un sujeto, que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGFβ, capecitabina y/o ixabepilona, en el que dicho antagonista de TGFβ está presente en una cantidad eficaz para potenciar la eficacia de la capecitabina y/o ixabepilona para tratar dicho cáncer de mama. En algunas realizaciones, una primera composición farmacéutica comprende un antagonista de TGFβ, una segunda composición farmacéutica comprende capecitabina, y una tercera composición farmacéutica comprende ixabepilona. Estas composiciones individuales y separadas pueden administrarse independientemente o juntas.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, ácido nucleico, vector, célula huésped, o agentes de quimioterapia de la presente invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. "Vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquier excipiente que sea no tóxico para la célula o mamífero que se expone a él a las dosificaciones y concentraciones empleadas. La composición farmacéutica puede incluir un agente terapéutico o agentes terapéuticos adicionales.

Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, tampones, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes humectantes, conservantes, tampones, agentes quelantes, antioxidantes, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción.

Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua; solución salina; solución salina tamponada con fosfato; dextrosa; glicerol; alcoholes tales como etanol e isopropanol; fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; EDTA; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS; agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol, y cloruro sódico; además de combinaciones de los mismos. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse en una variedad de formas, que incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semi-sólida y sólida, tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. En algunas realizaciones, las composiciones están en forma de disoluciones inyectables o infusibles. La composición está en una forma adecuada para administración oral, intravenosa, intrarterial, intramuscular, subcutánea, parenteral, transmucosa, transdérmica o tópica. La composición puede formularse como una composición de liberación inmediata, controlada, prolongada o retardada.

Preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. En la invención objeto, vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o 0,8 % de solución salina. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Más particularmente, composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente se preservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16^a. (1980).

En algunas realizaciones, la composición incluye agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando la molécula, por sí misma o en combinación con otros agentes activos, en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, un método de preparación es secado a vacío y liofilización, que da un polvo de un principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se envasan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan bajo condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y comercializarse en forma de un kit tal como aquellos descritos en publicación de solicitud de EE.UU. N.º 2002/0102208 A1, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Tales artículos de fabricación tendrán preferentemente etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un sujeto que padece, o tiene predisposición a trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones o enfermedades que se describen en el presente documento, varían dependiendo de muchos factores diferentes, que

incluye medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si tratamiento es profiláctico o terapéutico. Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento pueden valorarse usando métodos rutinarios conocidos para aquellos expertos en la materia para optimizar la seguridad y la eficacia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz". Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la molécula para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la molécula se sobrepasa por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

La invención proporciona además un kit que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGF β , capecitabina, ixabepilona, o combinación de los mismos.

La invención proporciona además métodos de tratamiento de una enfermedad o afección, que comprenden administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TGF β , capecitabina, ixabepilona, o combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a tratamiento terapéutico, que incluye medidas profilácticas o preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico no deseado asociado a una enfermedad o afección. Resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, reducción del grado de una enfermedad o afección, estabilización de una enfermedad o afección (es decir, en la que la enfermedad o afección no empeora), retraso o ralentizamiento de la progresión de una enfermedad o afección, mejora o paliación de la enfermedad o afección, y remisión (tanto parcial como total) de la enfermedad o afección, tanto detectable como no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada sino se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la enfermedad o afección, además de aquellos propensos a tener la enfermedad o afección, o aquellos en los que va a prevenirse la enfermedad o afección.

Cánceres/tumores que pueden tratarse por la invención incluyen cualquier cáncer o tumor. Ejemplos de cánceres/tumores que puede tratarse incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama (incluyendo HER2+ y metastásico), un cáncer tratado por capecitabina, ixabepilona, o ambas, o un cáncer asociado a la señalización mediada por TGF β .

Métodos de tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, inhibir la angiogénesis en el tumor, inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la migración tumoral, inhibir la proliferación o inhibir la invasión de células tumorales.

Los cánceres que expresan o expresan en exceso o están asociados a la expresión o expresión en exceso de TGF β pueden tratarse por la invención. Sin embargo, el cáncer que va a tratarse por la terapia de combinación en el presente documento puede ser cualquier cáncer, no simplemente aquellos que expresan o expresan en exceso TGF β .

Los cánceres que van a tratarse incluyen tumores primarios y tumores secundarios o metastásicos (incluyendo aquellos metastatizados de pulmón, mama o próstata), además de tumores recurrentes o resistentes al tratamiento. Los tumores recurrentes engloban tumores que parece que se inhiben mediante el tratamiento con tales agentes, pero vuelven a aparecer hasta cinco años, algunas veces hasta diez años o más, después de interrumpirse el tratamiento. Los tumores resistentes al tratamiento son tumores que han dejado de responder o son resistentes al tratamiento con una o más terapias convencionales para el tipo de tumor particular. Los tumores resistentes al tratamiento incluyen aquellos que son resistentes al tratamiento con hormonas (por ejemplo, cáncer de próstata independiente de andrógenos; o cáncer de mama resistente al tratamiento con hormonas, tal como cáncer de mama que es resistente al tratamiento con tamoxifeno); aquellos que son resistentes al tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos; aquellos que son resistentes al tratamiento con radiación; y aquellos que son resistentes al tratamiento con combinaciones de quimioterapia y radiación, quimioterapia y terapia hormonal, o terapia hormonal y radiación.

La terapia puede ser de "primera línea", es decir, como tratamiento inicial en pacientes que no han tenido tratamientos previos contra el cáncer, tanto solo como en combinación con otros tratamientos; o de "segunda línea", como un tratamiento en pacientes que han tenido una pauta de tratamiento previo contra el cáncer, tanto solo como en combinación con otros tratamientos; o como tratamientos de "tercera línea", "cuarta línea", etc., tanto solos como en combinación con otros tratamientos.

La terapia también puede administrarse a pacientes que han tenido tratamientos previos que han sido parcialmente satisfactorios, pero son intolerantes al tratamiento particular. La terapia también puede administrarse como un

tratamiento adyuvante, es decir, para prevenir la re-manifestación del cáncer en pacientes con enfermedad actualmente no detectable o después de la extirpación quirúrgica del tumor.

Los cánceres que pueden tratarse incluyen tumores que no están vascularizados, o todavía no están sustancialmente vascularizados, además de tumores vascularizados. Los cánceres pueden estar comprendidos de tumores no sólidos (tales como leucemias y linfomas) o pueden ser tumores sólidos. Tipos de cánceres que van a tratarse con los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o tumores malignos linfoides, tumores benignos y malignos, y tumores malignos, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. Están incluidos tumores/cánceres en adultos y tumores/cánceres pediátricos.

Puede administrarse más de un antagonista de TGF β , tanto incorporado en la misma composición como administrado como composiciones separadas.

El antagonista de TGF β puede administrarse solo, o en combinación con uno o más agentes terapéuticamente eficaces (por ejemplo, capecitabina, ixabepilona, o ambas) o tratamientos. El otro agente terapéuticamente eficaz puede conjugarse con el antagonista de TGF β , incorporarse en la misma composición que el antagonista de TGF β , o puede administrarse como una composición separada. El otro agente terapéutico o tratamiento puede administrarse antes, durante y/o después de la administración del antagonista de TGF β .

En una realización, el antagonista de TGF β se co-administra con capecitabina, ixabepilona, o una combinación de las mismas. En otra realización, el antagonista de TGF β se administra independientemente de la administración de la capecitabina, ixabepilona, o una combinación de las mismas. En una realización, el antagonista de TGF β se administra primero, seguido de la administración de la capecitabina, ixabepilona, o una combinación de las mismas. En otra realización, la capecitabina, ixabepilona, o una combinación de las mismas, se administra primero, seguido de la administración del antagonista de TGF β .

Otros agentes / tratamientos terapéuticamente eficaces incluyen cirugía, antineoplásicos (incluyendo agentes quimioterapéuticos y radiación), agentes antiangiogénesis, anticuerpos para otras dianas, moléculas pequeñas, terapia fotodinámica, inmunoterapia, agentes citotóxicos, citocinas, quimiocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de cinasas, cardioprotectores, agentes inmunoestimulantes, agentes inmunosupresores, agentes que promueven la proliferación de células hematológicas, e inhibidores de proteínas tirosina cinasa (PTK).

Un agente quimioterapéutico puede administrarse como un profármaco. El término "profármaco" se refiere a un precursor o derivado de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco original y es capaz de ser enzimáticamente activado o convertido en la forma original más activa. Los profármacos que pueden encontrar uso con las composiciones y métodos como se proporcionan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para su uso con los anticuerpos y fusiones de Fc de las composiciones y métodos como se proporcionan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los agentes quimioterapéuticos anteriormente mencionados.

La administración del antagonista de TGF β con otros agentes (por ejemplo, capecitabina, ixabepilona, o ambas) y/o tratamientos puede producirse simultáneamente, o por separado, mediante la misma vía o diferentes, al mismo tiempo o en momentos diferentes. Las pautas de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

En un ejemplo, puede administrarse un único bolo. En otro ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo. En otro ejemplo más, una dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para tratar sujetos mamíferos. Cada unidad puede contener una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado. En algunas realizaciones, las formas unitarias de dosificación de la invención están impuestas por y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que va a lograrse.

La composición de la invención puede administrarse solo una vez, o puede administrarse múltiples veces. Para dosificaciones múltiples, la composición puede administrarse, por ejemplo, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, semanalmente, una vez cada dos semanas, o mensualmente.

Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección que va a aliviarse. Debe entenderse adicionalmente que, para cualquier sujeto particular, las pautas de dosificación

específicas deben ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son a modo de ejemplo solo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

- 5 “Administración” a un sujeto no se limita a ningún sistema de administración particular y puede incluir, sin limitación, parenteral (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intrarticular, intramuscular o intraperitoneal), rectal, tópica, transdérmica u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos). La administración a un huésped puede producirse en una dosis única o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una variedad de formas de sal fisiológicamente aceptables, y/o con un vehículo farmacéutico aceptable y/o aditivo como parte de una composición farmacéutica (descrita anteriormente). De nuevo, las formas de sal fisiológicamente aceptable y las técnicas de formulación farmacéutica estándar son muy conocidas para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.).

- 15 La composición de la invención (por ejemplo, antagonista de TGF β) puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Además, la composición de la invención puede administrarse por infusión o inyección intravenosa. La composición de la invención puede administrarse por inyección intramuscular o subcutánea. En algunas realizaciones, la composición de la invención (por ejemplo, capecitabina y/o ixabepilona) puede administrarse por vía oral. Como se usa en el presente documento, una “composición” se refiere a cualquier composición que contenga una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más principios activos (por ejemplo, un antagonista de TGF β , capecitabina, ixabepilona, o una combinación de las mismas).

Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden usarse para tratar cualquier mamífero adecuado, que incluye primates, tales como monos y seres humanos, caballos, vacas, gatos, perros, conejos y roedores tales como ratas y ratones. En una realización, el mamífero que va a tratarse es humano.

- 25 Todas las patentes y las referencias bibliográficas citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por este documento por referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Estudio 1: Los efectos de 1D11, ixabepilona, capecitabina y combinaciones de estos terapéuticos sobre el crecimiento de tumores primarios y metástasis en un modelo de cáncer de mama triple negativo singénico (4T1).

- 30 Clínicamente, se ha mostrado que la combinación de los quimioterapéuticos ixabepilona y capecitabina es eficaz en el tratamiento de cáncer de mama triple negativo (TNBC) metastásico o localmente avanzado que ha sido resistente a taxanos. Este estudio preclínico se realizó para: (1) determinar los efectos de 1D11, ixabepilona y capecitabina como agentes únicos sobre el crecimiento de tumores 4T1 subcutáneos y posterior metástasis a los pulmones, (2) determinar si las terapias de combinación con estos agentes producen efectos aditivos o sinérgicos sobre la eficacia de agentes individuales, y (3) proporcionar percepción en las posibles cuestiones de seguridad/toxicidad con estas terapias de combinación.

Métodos experimentales:

Table 1: Resumen del estudio

Grupo N.º	Grupos de tratamiento	Animales por grupo
1	Vehículo de anticuerpo	10
2	13C4 10 mg/kg	10
3	1D11 10 mg/kg	10
4	Vehículo de anticuerpo + Capecitabina	10
5	13C4 + Capecitabina	10
6	1D11 + Capecitabina	10
7	Vehículo de anticuerpo + Ixabepilona	10
8	13C4 + Ixabepilona	10
9	1D11 + Ixabepilona	10

Grupo N.º	Grupos de tratamiento	Animales por grupo
10	Vehículo de anticuerpo + Capecitabina + Ixabepilona	10
11	13C4 + capecitabina + Ixabepilona	10
12	1D11 + Capecitabina + Ixabepilona	10

Momentos de tiempo:

Día 0: Los investigadores inyectan 50.000 células 4T1 + Matrigel por vía subcutánea en el flanco derecho

Día 3: Los investigadores empiezan las mediciones de los tumores 2-3X/semana

Día 6: El personal de DCM empieza a dosificar anticuerpo IP 3X/semana

El personal de DCM empieza a dosificar ixabepilona IV Q4Dx3

El personal de DCM empieza a dosificar capecitabina por sonda nasogástrica oral QDx14

Los animales se sacrificaron cuando los tumores primarios alcanzaron un volumen de 2000 mm³ o antes del cierre del estudio si se presentaron condiciones moribundas (falta de acicalamiento, respiración fatigosa, caquexia, anorexia o letargo). Después del sacrificio, el tumor primario se dividió en dos, incorporándose una mitad en OCT, y la otra se puso en formalina tamponada con cinc. Se recogieron los pulmones y cualquier otro tejido que llevara metástasis y se guardaron en formalina tamponada con cinc para el recuento de metástasis de pulmón e IHC.

Tejidos: Tumores primarios en OCT y formalina tamponada con cinc, pulmones recogidos en formalina tamponada con cinc para la evaluación de metástasis y posterior IHC.

En el día 0, 150 ratones BALB/c hembra de doce semanas de edad recibieron cada uno inyecciones subcutáneas de 50.000 células 4T1 en Matrigel en el flanco derecho. Los ratones portadores de tumor se monitorizaron rutinariamente y se realizaron mediciones del tumor regulares 2-3X/semana empezando en el día 6. El volumen del tumor se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen del tumor} = \text{Longitud} \times \text{Anchura}^2 \times 0,52$$

Seis días después de la inyección de células tumorales, cuando los volúmenes del tumor tuvieron en promedio 80 mm³, los animales se agruparon por tamaño y se dividieron en doce grupos de tratamiento de diez ratones cada uno. Se sacaron del estudio treinta ratones con tumores primarios que fueron o bien significativamente más grandes que el promedio o bien que no fueron palpables (0 mm³). En este momento, los investigadores se cegaron a las designaciones de los grupos de tratamiento y se inició la administración terapéutica. Todos los ratones recibieron 10 mg/kg de o bien 1D11, 13C4 o bien vehículo de anticuerpo administrado en 100 µl IP tres veces por semana (Tabla 1). Cohortes específicas de ratones recibieron tratamientos adicionales de ixabepilona (6 mg/kg en 200 l IV Q4Dx3), capecitabina (360 mg/kg en 100 µl por sonda nasogástrica oral QDx14) o ambas.

Los ratones se sacrificaron una vez los volúmenes del tumor primario alcanzaron 2000 mm³ o mayores o si los tumores llegaron a ulcerarse en >20 % del área superficial del tumor, o si los animales presentaron condiciones moribundas (falta de acicalamiento, respiración fatigosa, caquexia, anorexia o letargo). Tras el sacrificio, se realizaron autopsias macroscópicas y se recogieron los tumores, pulmones y otros tejidos portadores de metástasis. Una porción del tumor primario se congeló en OCT para IHC de inmunomarcadores, y el tumor restante y otros tejidos portadores de metástasis se fijarán en cinc-formalina para la incorporación en parafina.

Resultados:

Estudio 09-3493 Los ratones del estudio recibieron tratamientos de vehículo de anticuerpo, 13C4 o 1D11 tres veces a la semana durante siete semanas consecutivas. No hubo dificultad con la dosificación de ixabepilona, capecitabina o terapéuticos de anticuerpo; probablemente debido al uso de ratones BALB/c de Charles River en este estudio.

Tabla 2. Acontecimientos adversos evidentes relacionados con el tratamiento en el estudio.

Grupo N.º	Ratón ID N.º	Estado	Día de estudio	Observaciones
Vehículo + Cape + Ixa	B7171	se encontró muerto	14	Demacrado y encorvado. Sin tumor primario palpable. Se encontró muerto por la tarde tras el quimioterapéutico.
Vehículo + Cape + Ixa	B1741	moribundo	20	Demacrado y encorvado. Presentó sacudidas musculares espasmódicas. Se sacrificó debido a estado moribundo.
Vehículo + Cape + Ixa	B1793	se encontró muerto	17	Demacrado y encorvado. Sin tumor primario palpable.
Vehículo + Cape + Ixa	B1835	moribundo	20	Demacrado y encorvado. Presentó sacudidas musculares espasmódicas. Incapacidad para usar las patas traseras. Se sacrificó debido a estado moribundo.
13C4 + Cape + Ixa	B1718	se encontró muerto	16	Demacrado y encorvado. Sin tumor primario palpable.
13C4 + Cape + Ixa	B1765	se encontró muerto	18	Demacrado y encorvado. Pequeño tumor primario palpable. No se tomaron tejidos.
13C4 + Cape + Ixa	B1787	se encontró muerto	18	Demacrado y encorvado. Pequeño tumor primario palpable. No se tomaron tejidos.
13C4 + Cape + Ixa	B1804	moribundo	17	Demacrado y encorvado. Incapacidad para usar las patas traseras. Se sacrificó debido a estado moribundo
1D11 + Cape + Ixa	B1800	se encontró muerto	14	Demacrado y encorvado. Sin tumor primario palpable. Se encontró muerto por la tarde tras el quimioterapéutico.
1D11 + Cape + Ixa	B1808	se encontró muerto	18	Demacrado y encorvado. Sin tumor primario palpable. No se tomaron tejidos.

Varios ratones en este estudio en la cohorte de capecitabina+ixabepilona o bien se encontraron muertos o bien necesitaron ser sacrificados debido a la presentación de condiciones moribundas. Estas toxicidades relacionadas con el tratamiento se describen en la Tabla 1. Los ratones que requirieron eutanasia estaban demacrados, descuidados, encorvados y tenía dificultad para respirar. Algunos ratones en los grupos tratados con ixabepilona presentaron algo de neuropatía periférica; los ratones tuvieron dificultad para deambular con sus extremidades traseras. Sin embargo, como se observa en estudios previos que probaron ixabepilona en este modelo, la neuropatía se resolvió tras la última dosis de quimioterapéuticos. La adición de 1D11 a los quimioterapéuticos no aumentó ni disminuyó la incidencia de estas toxicidades.

Hubo efectos diferenciales sobre el crecimiento tumoral dependiendo del tratamiento proporcionado (Fig. 1). Como agente único, 1D11 no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de tumores 4T1 SQ (Fig. 2A). Como monoterapia, la ixabepilona fue la más eficaz en inhibir el crecimiento tumoral de 4T1 en comparación con o bien la terapia con anticuerpos o bien capecitabina, aunque la capecitabina también inhibió el crecimiento tumoral. La adición de 1D11 a la terapia con capecitabina produjo una eficacia mejorada con respecto a la capecitabina sola o con 13C4 (Fig. 2B), sin embargo, 1D11 no mejoró la eficacia de la ixabepilona sola (Fig. 2C).

La inhibición más fuerte del crecimiento tumoral se observó en ratones que recibieron la terapia de combinación de 1D11+capecitabina+ixabepilona que tuvo eficacia mejorada con respecto a capecitabina+ixabepilona sola o con 13C4 (Fig. 3A). La combinación de capecitabina e ixabepilona fue más eficaz que la capecitabina sola (Fig. 3B), sin embargo, esta combinación no fue más eficaz que la terapia de ixabepilona (Fig. 3C). Basándose en las terapias que implican a 1D11, 1D11+capecitabina+ixabepilona fue más eficaz que 1D11+ixabepilona, que fue más eficaz que 1D11+capecitabina, que fue más eficaz que 1D11 como agente único (Fig. 4).

Las diferentes pautas de tratamiento tuvieron efectos variables sobre la supervivencia. Los ratones tratados con terapias de anticuerpo o capecitabina sola tuvieron curvas de supervivencia similares (Fig. 5). Los ratones tratados con ixabepilona sola o en combinación con capecitabina tuvieron supervivencia similar, que fue superior a la de tanto el anticuerpo como las cohortes de capecitabina. 1D11 como agente único no mejoró la supervivencia, pero 1D11+capecitabina tuvo supervivencia mejorada con respecto a la capecitabina sola. 1D11 tampoco mejoró el beneficio de supervivencia de ixabepilona sola, sin embargo, se observó la mayor mediana de la supervivencia en el grupo de tratamiento con 1D11+capecitabina+ixabepilona. Las curvas de supervivencia también han sido afectadas por la toxicidad debido a pautas quimioterapéuticas como se ha descrito anteriormente.

1D11 no aumentó el tiempo requerido para alcanzar el punto final del tamaño de 2000 mm³ como agente único y no mejoró el tiempo hasta el punto final en animales tratados con ixabepilona (Fig. 6). Sin embargo, 1D11 mejoró el tiempo hasta el punto final en la cohorte de capecitabina, y se observó tiempo más largo hasta el punto final en el estudio en el grupo de 1D11+capecitabina+ixabepilona.

El tratamiento con 1D11 condujo a un aumento en la metástasis a los pulmones dentro de cada cohorte (Fig. 7). El grupo de agente único de 1D11 tuvo aumentos significativos en el número de metástasis de pulmón en comparación con el grupo tratado con vehículo o el grupo tratado con 13C4 y se observaron aumentos similares debido al tratamiento con 1D11 en las cohortes de capecitabina, ixabepilona y de capecitabina+ixabepilona (Fig. 8). El número de metástasis de pulmón aumentó en función del tiempo que un animal estuvo en el estudio, y este efecto fue independiente del grupo de tratamiento (Fig. 9).

En la clínica, se ha informado que la terapia de combinación de ixabepilona y capecitabina es más eficaz que la capecitabina sola en cáncer de mama triple negativo (TNBC) resistente a taxanos. El modelo de carcinoma mamario murino 4T1 se usa rutinariamente como un buen sustituto para TNBC humano y para prueba preclínica de terapéuticos contra TNBC. El fin del estudio era determinar si 1D11 mejoraría o no la eficacia de capecitabina, ixabepilona, o la combinación de los dos quimioterapéuticos, contra el crecimiento de tumores primarios y/o posterior metástasis en el modelo de 4T1 singénico de TNBC.

Como se observa en estudios previos con este modelo, 1D11 como agente único no inhibió significativamente el crecimiento de tumores 4T1 SQ primarios. Sin embargo, 1D11 mejoró la eficacia de capecitabina y la terapia de combinación de capecitabina+ixabepilona contra tumores primarios. En realidad, la combinación triple de 1D11+capecitabina+ixabepilona fue la más eficaz en inhibir el crecimiento de tumores primarios 4T1, y también proporcionó el mayor beneficio de supervivencia y produjo el tiempo más largo hasta el punto final. Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que combinar una estrategia de neutralización de TGFβ con terapia de capecitabina+ixabepilona puede proporcionar un beneficio terapéutico con respecto al tratamiento con capecitabina+ixabepilona sola.

Estos datos representan la primera mejora de la eficacia de un quimioterapéutico en el modelo de tumor 4T1 SQ. Previamente en este modelo, 1D11 se había combinado con paclitaxel, cisplatino o carboplatino y en cada uno de estos estudios 1D11 no mejoró la eficacia del quimioterapéutico probado.

En este estudio, el combinar 1D11 con capecitabina mejoró la eficacia observada con capecitabina sola, sugiriendo que la eficacia mejorada en el grupo de 1D11 + capecitabina + ixabepilona con respecto al grupo de capecitabina+ixabepilona puede ser debida a la mejora de los efectos de la capecitabina sobre el crecimiento tumoral. La capecitabina es un profármaco oral que se convierte en 5-fluorouracilo, que bloquea la síntesis de ADN actuando como mimético de pirimidina. El mecanismo antitumoral es similar al de la gemcitabina. De forma interesante, 1D11 no mejoró la eficacia de la gemcitabina en modelos de cáncer pancreático, sugiriendo que la mejora observada en este estudio depende del fármaco específico, modelo de tumor, o ambos.

Sorprendentemente, el tratamiento con 1D11 produjo elevadas metástasis en cada cohorte en vez de una mejora del efecto de cada quimioterapéutico.

En este estudio, las toxicidades relacionadas con el tratamiento tales como pérdida de peso, un aspecto descuidado y encorvado, y dificultad para respirar se observaron en ratones que recibieron las terapias de quimioterapéutico-combinación. Los ratones que recibieron ixabepilona presentaron neuropatía periférica en forma de inmovilidad de las extremidades traseras que se resolvió una vez se completó la terapia de tratamiento. 1D11 no tuvo efecto sobre la incidencia o gravedad de estas toxicidades.

EJEMPLO 2

Estudio 2: Los efectos de 1D11, ixabepilona, capecitabina y combinaciones de estos terapéuticos sobre el crecimiento de tumores primarios y metástasis en un modelo de cáncer de mama triple negativo singénico (4T1).

Métodos experimentales:

Los grupos de tratamiento, momentos de tiempo y tejidos fueron similares al estudio descrito anteriormente. En el día 0, 150 ratones BALB/c hembra de doce semanas de edad recibieron cada uno inyecciones subcutáneas de 50.000 células 4T1 en Matrigel en el flanco derecho. Los ratones portadores de tumor se monitorizaron rutinariamente y se realizaron mediciones del tumor regulares 2-3X/semana empezando en el día 6. El volumen del tumor se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen del tumor} = \text{Longitud} \times \text{Anchura}^2 \times 0,52$$

Seis días después de la inyección de células tumorales, cuando los volúmenes del tumor tuvieron en promedio ~70 mm³, los animales se agruparon por tamaño y se dividieron en doce grupos de tratamiento de diez ratones cada uno. Se sacaron del estudio treinta ratones con tumores primarios que fueron o bien significativamente más grandes que el promedio o bien que no fueron palpables (0 mm³). En este momento, los investigadores se cegaron a las

designaciones de los grupos de tratamiento y se inició la administración terapéutica. Todos los ratones recibieron 10 mg/kg de o bien 1D11, 13C4 o bien vehículo de anticuerpo administrado en 100 µl IP tres veces por semana (Fig. 10). Cohortes específicas de ratones recibieron tratamientos adicionales de ixabepilona (3 mg/kg en 200 µl IV Q4Dx3), capecitabina (360 mg/kg en 100 µl por sonda nasogástrica oral QDx14) o ambas.

Los ratones se monitorizaron para ulceración excesiva o presentación de condiciones moribundas (falta de acicalamiento, respiración fatigosa, caquexia, anorexia o letargo). Para el análisis apropiado de las metástasis, todos los ratones se sacrificaron en el día del estudio 23. Tras el sacrificio, se realizaron autopsias macroscópicas y se recogieron los tumores, pulmones y otros tejidos portadores de metástasis. El tumor primario se dividió en dos, congelándose una mitad en OCT y la otra mitad se guardó en RNA Later para el análisis por qPCR. Los pulmones se fijaron en formalina tamponada con cinc para el recuento de metástasis pulmonares y el posterior análisis de IHC.

Resultados:

En el día de estudio 23, los ratones habían recibido ocho tratamientos de vehículo de anticuerpo, 13C4 o 1D11. No se observaron problemas de toxicidad durante la dosificación de o bien la ixabepilona, capecitabina o bien los terapéuticos de anticuerpo en este estudio. Todos los animales se sacaron en el día de estudio 23, excepto un ratón que se sacrificó antes del cierre debido a que el tumor se ulceró.

Los tumores en este estudio crecieron a una velocidad ligeramente más lenta que en estudios previos, y por consiguiente fueron comparativamente pequeños cuando el estudio se terminó en el día de estudio 23.

A pesar del tamaño reducido del tumor en este estudio, se observaron claras diferencias entre los volúmenes medios del tumor entre grupos de tratamiento (Figs. 10 y 11). En particular, una reducción significativa en el volumen del tumor estuvo presente en los días de estudio 20 y 22 cuando se comparan animales dosificados con 1D11 como agente único con aquellos que recibieron 13C4 solo, aunque el tratamiento con 1D11 produjo una tendencia estadísticamente insignificante de la inhibición del crecimiento debido a 1D11 en comparación con animales tratados con vehículo (Fig. 11A). El tratamiento con capecitabina produjo una tendencia hacia el crecimiento inhibido de los tumores primarios y se observó una reducción significativa en el volumen del tumor tras el tratamiento con ixabepilona. La adición de 1D11 a la terapia con capecitabina produjo una tendencia estadísticamente insignificante hacia eficacia mejorada con respecto a la capecitabina sola (Fig. 11B). El combinar 1D11 con ixabepilona produjo eficacia mejorada en comparación con ixabepilona sola, pero cuando se comparó con 13C4+ixabepilona (Fig. 11C).

El beneficio añadido de combinar ixabepilona y capecitabina con respecto a cualquier quimioterapéutico solo observado en el Estudio 09-3493 se confirmó en este estudio (Fig. 12A). La terapia de combinación de capecitabina e ixabepilona fue significativamente más eficaz en inhibir el crecimiento tumoral de 4T1 SQ que la capecitabina (Fig. 12B), y hubo un ligero beneficio con respecto a la ixabepilona sola (Fig. 12C). La inhibición más fuerte del crecimiento tumoral se observó en ratones que recibieron la terapia de combinación de 1D11+capecitabina+ixabepilona que tuvo eficacia mejorada con respecto a capecitabina+ixabepilona sola o con 13C4 (Fig. 12A), confirmando los datos del Estudio 09-3493. Basándose en las terapias que implican a 1D11, 1D11+capecitabina+ixabepilona fue más eficaz que 1D11+ixabepilona, que fue más eficaz que 1D11+capecitabina, que fue más eficaz que 1D11 como agente único (Fig. 13).

El tratamiento con 1D11 no inhibió el número de metástasis pulmonares como agente único (Fig. 14). La metástasis disminuyó significativamente en cohortes que recibieron terapias de combinación y el número promedio de metástasis en cada una de estas cohortes fue inferior a 10. Tanto 1D11+ixabepilona como 13C4+ixabepilona redujeron el número de metástasis en comparación con capecitabina, pero no hubo diferencias entre grupos de tratamiento en las cohortes de capecitabina o de capecitabina+ixabepilona.

Este estudio es el segundo estudio para determinar el efecto de añadir 1D11 a la combinación de los quimioterapéuticos ixabepilona y capecitabina sobre la inhibición del crecimiento de tumores primarios y la prevención de metástasis pulmonares. Similar al primer estudio, 09-3493, 1D11 no tuvo mucho efecto sobre el crecimiento de tumores primarios como agente único. Hubo una tendencia hacia la inhibición en el grupo de 1D11 cuando se comparó con el grupo tratado con 13C4, pero esta significancia se perdió cuando se comparó con el grupo tratado con vehículo. También hubo tendencias que muestran que 1D11 mejoró la eficacia de capecitabina e ixabepilona, aunque en el último caso, la mejora de la eficacia de la ixabepilona fue similar a aquella por 13C4. Sin embargo, en este estudio, como en 09-3493, la inhibición más significativa del crecimiento tumoral de 4T1 se observó en los ratones tratados con 1D11+capecitabina+ixabepilona. La mejora de la eficacia fue evidente aún cuando los animales se sacaron en un momento de tiempo en el que la separación entre grupos de tratamiento estaba empezando a producirse. Tomados conjuntamente, los datos de estos dos estudios demuestran claramente que combinar una estrategia de neutralización de TGFβ con terapia de capecitabina+ixabepilona puede proporcionar un beneficio terapéutico con respecto al tratamiento con capecitabina+ixabepilona sola.

Tomados conjuntamente, los datos de estos dos estudios representan la primera mejora de la eficacia de un quimioterapéutico en el modelo de tumor 4T1 SQ. Previamente en este modelo, 1D11 se ha combinado con paclitaxel, cisplatino o carboplatino y en cada uno de estos estudios 1D11 no mejoró la eficacia del quimioterapéutico probado.

En el Estudio 09-3493, la mejora de la eficacia de capecitabina+ixabepilona podría atribuirse posiblemente a la mejora de la eficacia de la capecitabina, ya que 1D11 mejoró la eficacia de la capecitabina sola, pero no la de la ixabepilona. En este estudio hubo una tendencia hacia la mejora de la eficacia por 1D11 en la cohorte de capecitabina, pero no fue estadísticamente significativo. Pareció que 1D11 mejoró la eficacia de ixabepilona, pero se observó un resultado similar cuando la ixabepilona se combinó con 13C4. Es probable que si hubiera habido mejor separación de los grupos de tratamiento en cada cohorte el estudio se hubiera llevado a cabo más tiempo. Esto tendrá que tratarse en próximos estudios con el fin de determinar si la mejora de la eficacia de capecitabina+ixabepilona por 1D11 fue debida a la mejora de la actividad de capecitabina, ixabepilona, o es simplemente una función de cuando 1D11 se combina con ambos terapéuticos.

En el Estudio 09-3493, los animales que recibieron 6 mg/kg de ixabepilona normalmente presentaron neuropatía periférica, y muchos en la cohorte de ixabepilona+capecitabina llegaron a estar moribundos debido a la terapia y tuvieron que sacrificarse. En este estudio, la dosis de ixabepilona se redujo de 6 mg/kg a 3 mg/kg; una dosis que mostró eficacia contra el crecimiento tumoral de 4T1 en el estudio de MTD realizado mediante Pharm/Tox. Con esta dosis reducida de ixabepilona, ningún animal en el estudio presentó signos de toxicidad en ningún momento durante el estudio. Adicionalmente, la dosis de 3 mg/kg demostró ser eficaz contra el crecimiento de tumores primarios y/o la incidencia metastásica en este estudio. Como tal, el utilizar esta dosis más baja probablemente sería ventajoso en futuros estudios debido a la toxicidad reducida.

Además de ser capaz de observar efectos sobre el crecimiento de tumores primarios, este estudio se diseñó de tal manera que los efectos de 1D11 como agente único o en combinación con quimioterapéuticos sobre la metástasis del tumor primario 4T1 SQ a los pulmones también fueran distinguibles. Los animales se sacaron todos en el día 23 en vez de cuando cada tumor individual alcanzó 2000 mm³ (como en el Estudio 09-3493) con el fin de eliminar la posibilidad de una duración más larga del crecimiento tumoral que condujera a más metástasis. Sorprendentemente, 1D11 no inhibió las metástasis en este estudio como se había observado en otros modelos de tumor que incluyen el modelo intracardiaco de 4T1 de metástasis experimentales. Debe observarse, sin embargo, que el número de metástasis de pulmón en la cohorte de anticuerpo de agente único fue baja en cada grupo de tratamiento y especialmente baja en las cohortes de quimioterapéutico-combinación, que indica que quizás estos animales se sacaron antes que lo que debería haber sido. El tamaño promedio de los tumores en el momento del cierre del estudio fue ~1000 mm³ en la cohorte de anticuerpo, ~700 mm³ en la cohorte de capecitabina y a o por debajo de 500 mm³ en las cohortes de ixabepilona e ixabepilona+capecitabina. La gran mayoría de las metástasis presentes fueron inferiores a 1 mm de tamaño entre todas las cohortes. En estudios previos, números fiables de metástasis (50-100 por conjunto de pulmones) no estuvieron presentes hasta que los tumores primarios alcanzaron ~1500 mm³.

EJEMPLO 3

Estudio 3: Los efectos de 1D11, ixabepilona, capecitabina y combinaciones de estos terapéuticos sobre el crecimiento de tumores primarios y metástasis en un modelo de cáncer de mama triple negativo singénico (4T1).

Métodos experimentales:

En el día 0, 150 ratones BALB/c hembra de doce semanas de edad recibieron cada uno inyecciones subcutáneas de 50.000 células 4T1 en Matrigel en el flanco derecho. Los ratones portadores de tumor se monitorizaron rutinariamente y mediciones del tumor regulares 2-3X/semana empezaron en el día 6. El volumen del tumor se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen del tumor} = \text{Longitud} \times \text{Anchura}^2 \times 0,52$$

Seis días después de la inyección de células tumorales, los animales se agruparon por tamaño y se dividieron en doce grupos de tratamiento de diez ratones cada uno. Los 30 animales restantes se incluyeron en un experimento de compañía a este estudio, buscando los efectos de 1D11 sobre el reclutamiento y la actividad de macrófagos (véase más adelante). En este momento, los investigadores se cegaron a las designaciones de los grupos de tratamiento y se inició la administración terapéutica. Todos los grupos de ratones recibieron tratamientos de o bien vehículo de anticuerpo, 1D11 o bien 13C4 administrados en 100 µl IP tres veces por semana. Cohortes específicas de ratones recibieron tratamientos adicionales de capecitabina (360 mg/kg en 100 µl por sonda nasogástrica oral durante 14 días consecutivos), ixabepilona (3 mg/kg en 200 µl IV cada cuatro días para tres tratamientos) o ambas.

Se sacrificó una cohorte entera de ratones cuando el volumen del tumor promedio para un único grupo dentro de esa cohorte alcanzó 1500 mm³ o mayor. Se sacrificaron ratones individuales antes del punto final del tamaño si los tumores se ulceraron o si los animales presentaron condiciones moribundas (falta de acicalamiento, respiración fatigosa, caquexia, anorexia o letargo). Tras el sacrificio, se realizaron autopsias macroscópicas y se recogieron los tumores, pulmones y otros tejidos portadores de metástasis. Una porción del tumor primario se congeló en OCT para IHC de inmunomarcadores, y el tumor restante y otros tejidos portadores de metástasis se fijaron en cinc-formalina para la incorporación en parafina.

Tabla 3: Resumen del estudio para experimentos con arginasa

Grupo N.º	Grupos de tratamiento	Animales por grupo
13	Vehículo de anticuerpo	10
14	13C4 10 mg/kg	10
15	1D11 10 mg/kg	10

Momentos de tiempo:

- Día 0: Los investigadores inyectan 50.000 células 4T1 + Matrigel por vía subcutánea en el flanco derecho
- Día 3: Los investigadores empiezan las mediciones de los tumores 2-3X/semana
- Día 6: El personal de DCM empieza a dosificar anticuerpo IP 3X/semana; siete tratamientos totales
- Día 21: 13-15 ratones del grupo se sacrifican y se recogen los tumores primarios

Tejidos Los tumores primarios en RPMI 1640 + 10 % de FBS se mantienen sobre hielo húmedo.

Los treinta ratones que no se pusieron en la porción de quimioterapéutico-combinación de este estudio se agruparon por tamaño y se dividieron en tres grupos adicionales tratados con vehículo de anticuerpo, 13C4 o 1D11 para evaluar la presencia de macrófagos M2 en el sitio del tumor primario (Tabla 3). Se recogieron los tumores primarios de estos ratones en el día de estudio 21. Los tumores se digirieron enzimáticamente en 5 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) que contenía 50 µg/ml de collagenasa I, 50 µg/ml de collagenasa IV, 25 µg/ml de hialuronidasa, 10 µg/ml de DNasa I y 0,2 U/ml de inhibidor de tripsina. Los tejidos se incubaron dos veces en la disolución de enzima durante 20 minutos a 37 °C con balanceo constante y se creó una suspensión de células usando el disociador de tejido gentleMACS. Las células disociadas y el tejido restante se pasaron a través de un filtro de 100 µm, luego un filtro de 40 µm en tubos de centrífuga de 50 ml. Las células se lavaron dos veces con HBSS y se contaron las células viables. Para enriquecer en células CD11b⁺, las células viables se ajustaron a 1,0x10⁷ células por 90 µl de PBS desgasificado que contenía 0,5 % de BSA libre de endotoxina y EDTA 2 mM y se incubaron con microesferas magnéticas anti-CD11b. Las células CD11b⁺ se seleccionaron positivamente usando AutoMacs Pro Separator. Las porciones de suspensiones de células CD11b⁺ individuales se tiñeron para CD11b, F4/80, CD206 y Gr-1. Las células CD11b⁺ restantes se lisaron para extraer arginasa.

Para el ensayo de arginasa celular, células enriquecidas se lavaron con PBS y 1,0x10⁶ células de cada tejido se añadieron a tubos de microcentrífuga de 0,5 ml separados. Las células se lavaron con PBS a 1000 g a 4 °C y las células sedimentadas se lisaron durante 10 minutos en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) que contenía 0,4 % de Triton X-100 e inhibidor de la proteasa. Los lisados se centrifugaron a 14.000 g y los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C hasta la fecha del ensayo. Los niveles de arginasa, como se ha determinado midiendo la conversión de arginina a ornitina y urea contra una curva de patrón de urea, se cuantificaron usando el kit Quantichrome Arginase (BioAssay System).

Para la inmunofenotipificación de células, 1,0x10⁶ células de cada tejido se bloquearon con 10 µg/ml de Fc Block (anti-CD16/32) durante 30 minutos antes de la tinción con anticuerpos para células derivadas de mieloides (CD11b), macrófagos (F4/80), macrófagos M2 (CD206) y MDSCs (Gr-1). La viabilidad celular se determinó usando Live/Dead Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen). Las células se fijaron durante 15 minutos en 1 % de paraformaldehído y los eventos se adquirieron en un citómetro de flujo BD LSR II. El análisis de datos se realizó usando el software Flow Jo (Fig. 15).

Resultados:

Hubo efectos diferenciales sobre el crecimiento tumoral dependiendo del tratamiento proporcionado, observándose el crecimiento tumoral más rápido en ratones tratados con terapia de anticuerpos sola, y el crecimiento más lento en ratones tratados con anticuerpo + capecitabina + ixabepilona (Fig. 16). En este estudio, una cohorte entera de animales se sacrificó el día que el volumen del tumor promedio en esa cohorte alcanzó un punto final del tamaño de 1500 mm³. Los ratones en la cohorte de terapia de anticuerpo sola alcanzaron un volumen medio del tumor de ~1500 mm³ en el día de estudio 23. Las cohortes de capecitabina y de ixabepilona demostraron crecimiento tumoral retardado, alcanzando el punto final en el día de estudio 27 y 29, respectivamente, mientras que la combinación de capecitabina e ixabepilona tuvo el retraso más largo ya que esta cohorte alcanzó el punto final a los 30 días.

Como agente único, 1D11 no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de tumores 4T1 SQ (Fig. 17A). El tratamiento con capecitabina produjo inhibición del crecimiento tumoral muy modesta, y la ixabepilona fue la más

eficaz en inhibir el crecimiento tumoral de 4T1 como monoterapia. La adición de 1D11 no mejoró la eficacia de ni la capecitabina (Fig. 17B) ni la ixabepilona (Fig. 17C).

La inhibición más fuerte del crecimiento tumoral se observó en ratones que recibieron la terapia de combinación de 1D11+capecitabina+ixabepilona que tuvo eficacia mejorada con respecto a capecitabina+ixabepilona sola o con 13C4 (Fig. 18A). Es muy sorprendente que la combinación de 1D11, capecitabina e ixabepilona produjera el volumen del tumor medio más pequeño, 1174,50 mm³, en el momento del sacrificio en comparación con los grupos de tratamiento de combinación de vehículo (1689,06 mm³) y 13C4 (1651,24 mm³) en esta cohorte. La combinación de capecitabina e ixabepilona fue más eficaz que la capecitabina sola (Fig. 18B), sin embargo, esta combinación solo fue ligeramente más eficaz que la terapia de ixabepilona (Fig. 18C). Basándose en las terapias que implican a 1D11, 1D11+capecitabina+ixabepilona fue más eficaz que 1D11+ixabepilona, que fue más eficaz que 1D11+capecitabina, que fue más eficaz que 1D11 como agente único (Fig. 19).

1D11 no tuvo efecto sobre el número de metástasis que se desarrollaron en los pulmones de ratones portadores de tumores primarios 4T1 SQ. El tratamiento con capecitabina + ixabepilona inhibió la metástasis y la eficacia de esta terapia de combinación, que se mejoró significativamente por 1D11 (Fig. 20).

Tabla 4: Porcentaje de MDSC totales y macrófagos de células CD11b⁺ aisladas de tumores primarios 4T1

	Vehículo de anticuerpo	10 mg/kg de 13C4	10 mg/kg de 1D11
Tumores primarios 4T1 (macrófagos totales)	22 %	23 %	26 %
Tumores primarios 4T1 (MDSC)	72 %	71 %	64 %
% total de células CD11b ⁺	94 %	94 %	90 %

La inmunofenotipificación de macrófagos totales (CD11b⁺, F4/80⁺), macrófagos M1 (CD11b⁺, F4/80⁺, CD206⁻), macrófagos M2 (CD11b⁺, F4/80⁺CD206⁺) y MDSC (CD11b⁺, Gr-1⁺) reveló que la mayoría de CD11b⁺ aisladas de tumores primarios 4T1 son MDSC (Tabla 1). Parece haber un ligero aumento en TAM y una disminución en el número de MDSC en tumores primarios tratados con 1D11 en comparación con controles. La medición cuantitativa de macrófagos totales, macrófagos M1 y macrófagos M2 se hizo por extrapolación al número total de células aisladas de tumores primarios recogidos de cada ratón individual (Fig. 21). Por este análisis, no hubo diferencia significativa en el número de macrófagos entre los grupos de tratamiento. Sin embargo, hay una tendencia de macrófagos M1 CD206⁻ elevados de tumores primarios (Fig. 21) de ratones tratados con 1D11.

Aunque el tratamiento con 1D11 no disminuyó el número de macrófagos M2 asociados a los tumores, 1D11 parece tener un efecto inhibitorio sobre la producción de arginasa por TAM. Los niveles de arginasa disminuyeron significativamente de lisados de células CD11b⁺ de ratones tratados con 1D11 en comparación con controles (Fig. 22, p <0,001 por análisis unilateral de ANOVA, prueba de múltiples comparaciones de Tukey).

En la clínica, se ha informado que la terapia de combinación de ixabepilona y capecitabina es más eficaz que la capecitabina sola en cáncer de mama triple negativo (TNBC) resistente a taxanos. El modelo de carcinoma mamario murino 4T1 se usa rutinariamente como un buen sustituto para TNBC humano y para prueba preclínica de terapéuticos contra TNBC. El fin del estudio anterior era determinar si 1D11 mejoraría la eficacia de la capecitabina, ixabepilona, o la combinación de los dos quimioterapéuticos, contra el crecimiento de tumores primarios y/o posterior metástasis en el modelo de 4T1 sintético de TNBC.

Este estudio se diseñó para determinar si 1D11 mejoraría el efecto de los quimioterapéuticos capecitabina e ixabepilona sobre la inhibición del crecimiento de tumores primarios 4T1 y metástasis del tumor primario a los pulmones. La inhibición del crecimiento tumoral más fuerte se observó en el grupo de tratamiento de 1D11 más capecitabina e ixabepilona. La combinación de capecitabina e ixabepilona también inhibió la metástasis a los pulmones y este efecto mejoró adicionalmente cuando se añadió 1D11 a la terapia de combinación. Como se ha observado en estudios previos con este modelo, 1D11 como agente único no tuvo efecto sobre el crecimiento de tumores primarios, no inhibió la metástasis, y no mejoró significativamente la eficacia de ni la capecitabina ni la ixabepilona cuando éstas se administraron como monoterapias.

Los resultados del Estudio 09-4255 confirman los resultados de dos estudios previos, 09-3493 y 09-3494, de que 1D11 puede mejorar significativamente la eficacia de la terapia de combinación de capecitabina e ixabepilona contra el crecimiento de tumores primarios 4T1 y este estudio fue el primero en demostrar que 1D11 también podría mejorar la inhibición de metástasis por capecitabina + ixabepilona. Estos datos representan la primera mejora de eficacia de un quimioterapéutico en el modelo de tumor 4T1 SQ. Previamente en este modelo, 1D11 se ha combinado con paclitaxel, cisplatino o carboplatino, y en cada uno de estos estudios 1D11 no mejoró la eficacia del quimioterapéutico probado.

Como 1D11 como agente único no tuvo efecto ni sobre el crecimiento de tumores primarios ni la metástasis, la adición de 1D11 a capecitabina + ixabepilona produce un efecto sinérgico. El motivo de esta sinergia todavía no se conoce. 1D11 solo mejora la eficacia de la combinación de capecitabina e ixabepilona y 1D11 no mejoró coherentemente la eficacia ni de capecitabina ni de ixabepilona cuando estos quimioterapéuticos se administraron individualmente. La actividad antitumoral de la capecitabina, un profármaco que se convierte en 5-fluorouracilo, es debida a su capacidad para funcionar de antagonista de pirimidina y la ixabepilona es un estabilizador de microtúbulos. En la clínica, la combinación de capecitabina e ixabepilona fue más eficaz que cualquier agente solo contra el cáncer de mama triple negativo. En el modelo de tumor 4T1, la eficacia de la terapia de combinación fue más fuerte que la capecitabina sola y solo fue marginalmente mejor que la observada con ixabepilona sola. Se supone que el direccionamiento de TGF β con 1D11 mejora la inmunidad antitumoral neutralizando los efectos inmunosupresores de TGF β derivados de tumor y de estroma. Es posible que estos efectos potencialmente suaves en un modelo tumoral agresivo tal puedan solo mejorar la eficacia quimioterapéutica cuando los tumores son atacados por múltiples terapéuticos que se dirigen a múltiples vías.

En el Estudio 09-3493, se observó toxicidad significativa en animales portadores de tumor tratados con la combinación de capecitabina e ixabepilona. Las dosis de cada terapéutico fueron 360 mg/kg y 6 mg/kg, respectivamente. La dosis de ixabepilona, que puede conducir a neuropatía, se redujo a 3 mg/kg en el segundo estudio en esta serie, 09-3494. Esto produjo una reducción significativa en la toxicidad y neuropatía, y por tanto esta dosis se usó en el presente estudio. Aún cuando se observó pérdida de peso en ratones que recibieron anticuerpo/tratamiento quimioterapéutico, hubo una reducción significativa de acontecimientos adversos graves tales como la parálisis de las extremidades traseras y muerte que se observó en el Estudio 09-3493. La pérdida de peso fue el efecto secundario más común de la terapia de combinación, sin embargo, la adición de 1D11 no aumentó ni disminuyó la incidencia de esta toxicidad.

Tomados conjuntamente, estos datos muestran que combinar una estrategia de neutralización de TGF β con terapia de capecitabina+ixabepilona proporcionará un beneficio terapéutico con respecto al tratamiento con capecitabina+ixabepilona sola en la clínica.

Dada la eficacia que los presentes inventores ven con 1D11 contra las metástasis en otros modelos de tumor y la mejora de capecitabina + ixabepilona en esta serie de estudios, se han realizado varios estudios que investigan el mecanismo de acción de 1D11. Se encontró que los linfocitos T citotóxicos (CTL) son críticos para la capacidad de 1D11 para inhibir metástasis en el modelo de tumor de la almohadilla plantar B16-F10 de metástasis espontánea. En el Estudio 09-4255 se realizó un experimento de compañía al estudio de eficacia principal para determinar si la neutralización de TGF β por 1D11 está afectando el reclutamiento, fenotipo y/o actividad de TAM.

Los TAMs clínicamente activados, también conocidos como macrófagos M1, son tumoricidas en parte mediante la NO sintasa inducible (iNOS). En cambio, los TAM alternativamente activados, o macrófagos M2, se han asociado a la progresión del tumor, promoviendo la invasión, metástasis y angiogénesis tumoral. Se ha informado en la bibliografía de que los macrófagos M2 secretan arginasa y son capaces de promover la proliferación de células tumorales mediante la vía de arginasa. Otro tipo de célula, MDSC, se recluta al sitio de tumores primarios en el que desempeñan una función inmunosupresora. Los MDSC y macrófagos también son grandes productores de TGF β que ayuda a promover la progresión del tumor.

La inmunofluorescencia de la co-localización de CD68/CD206 ha demostrado que los macrófagos M2 están presentes en tumores primarios 4T1 de ratones portadores de tumor no tratados. En el estudio actual hubo una tendencia observada hacia elevados números de macrófagos M1 tumoricidas en tanto tumores primarios como pulmones de ratones tratados con 1D11. El tratamiento con 1D11 no condujo a una disminución significativa de dos tipos de células, macrófagos M2 y MDSC, asociados a tumores primarios. Aunque el tratamiento con 1D1 no condujo a una disminución en el número de macrófagos M2 promotores de tumor o MDSC, hay una disminución significativa de arginasa intracelular de células CD11b⁺ aisladas de ambos tumores primarios 4T1. Esto demuestra la actividad farmacodinámica de 1D11 en el modelo debido a que se ha mostrado que TGF β regula por incremento la síntesis de arginasa, producida por macrófagos M2pro-tumorigénicos, y regula por disminución la síntesis de iNOS, que se produce por macrófagos M1antitumorigénicos. Se ha mostrado que la arginasa promueve la proliferación de células tumorales, por lo que inhibir la producción de arginasa por TGF β neutralizantes podría tener efectos perjudiciales sobre la proliferación y el crecimiento tumoral.

EJEMPLO 4:

La neutralización de TGF β con el anticuerpo para TGF β neutralizante de pan, 1D11, potencia selectivamente la eficacia de quimioterapéuticos en modelos de tumor preclínico

Se probó la combinación de neutralización de TGF- β , usando el anticuerpo monoclonal murino 1D11, y quimioterapéuticos seleccionados en modelos murinos de cáncer de mama, cáncer pancreático, melanoma y carcinoma de células renales. De las combinaciones probadas, solo la adición de 1D11 a la terapia de combinación de capecitabina + ixabepilona produjo coherentemente eficacia mejorada con respecto a la pauta quimioterapéutica sola. 1D11 mejoró rutinariamente la eficacia de capecitabina+ixabepilona contra el crecimiento de tumores primarios

e inhibió la metástasis en el modelo de tumor 4T1 subcutáneo (SQ) singénico y es la primera demostración de efectos aditivos cuando 1D11 se combina con quimioterapéuticos en varios estudios de cáncer.

Se combinó 1D11 con paclitaxel en tanto un modelo de cáncer de mama de xenoinjerto (MDA-MB-231) como el modelo de cáncer de mama 4T1 singénico. En estos estudios, 1D11 no mejoró la inhibición de tumores primarios por paclitaxel, y en los estudios de 4T1, 1D11 tampoco mejoró la capacidad de paclitaxel para inhibir las metástasis espontáneas de los tumores primarios a los pulmones. La combinación de 1D11 y ciclofosfamida también se probó en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231, y de nuevo, 1D11 no mejoró la eficacia de ciclofosfamida contra el crecimiento de tumores primarios. También se usaron los modelos de MDA-MB-231 y 4T1 para probar terapias de combinación con 1D11 y los compuestos de platino cisplatino o carboplatino. En modelos de 4T1 SQ, 1D11 no mejoró la eficacia de carboplatino contra el crecimiento de tumores primarios. En un modelo de 4T1 de metástasis experimental, en el que las células tumorales se inyectan en el ventrículo izquierdo del corazón produciendo siembra metastásica de los huesos, glándulas suprarrenales, riñones y pulmones, tanto 1D11 como el cisplatino fueron capaces de inhibir las metástasis particularmente al hueso, pero no se observó eficacia mejorada cuando se combinaron los dos terapéuticos.

No se observó mejora de la eficacia cuando 1D11 se combinó con quimioterapéuticos de referencia en modelos de cáncer pancreático o melanoma. La gemcitabina es el quimioterapéutico de primera línea para el cáncer pancreático y se probó la combinación de 1D11 y gemcitabina en un modelo SQ de xenoinjerto (Panc-1), un modelo singénico SQ (Pan02) y un modelo de ratón genéticamente manipulado (GEMM) de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) accionado por *Kras/p53* mutante. En los estudios de Panc-1, 1D11 no tuvo efecto sobre la eficacia de gemcitabina contra tumores primarios SQ, y se observó un efecto similar en GEMM de PDAC. Sin embargo, en el modelo de Pan02, el combinar 1D11 con gemcitabina redujo en realidad la eficacia de la gemcitabina contra el crecimiento de tumores primarios produciendo, crecimiento tumoral acelerado cuando se comparó con controles.

Se usó el modelo de melanoma murino B16-F10 para evaluar los efectos de combinar 1D11 con dacarbazina, el quimioterapéutico usado como terapia de primera línea en melanoma. En un modelo de B16-F10SQ, 1D11 no mejoró la eficacia de dacarbazina contra el crecimiento de tumores primarios. También se probó quimioterapéutico-combinación de 1D11 y dacarbazina en un modelo de metástasis espontáneas de melanoma murino B16-F10. En este modelo, se inyectaron células tumorales por vía subcutánea en la región plantar de ratones, en la que se desarrolla un tumor primario y metastatiza espontáneamente al ganglio linfático poplíteo regional. Al igual que en el modelo SQ, 1D11 no mejoró la eficacia de dacarbazina contra los tumores primarios, y adicionalmente no mejoró la eficacia de dacarbazina contra la metástasis al ganglio linfático drenante.

Finalmente, 1D11 se probó en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales Caki-1 en combinación con ciclofosfamida y paclitaxel, y en este estudio, pareció que 1D11 redujo la eficacia de cada uno de estos quimioterapéuticos.

En resumen, los datos muestran claramente que la neutralización de TGF β con 1D11 solo mejora la eficacia de quimioterapéuticos específicos. 1D11 mejoró la eficacia de la combinación de capecitabina e ixabepilona en un modelo de cáncer de mama preclínico, pero no mejoró la eficacia de paclitaxel, ciclofosfamida, cisplatino, carboplatino, gemcitabina o dacarbazina en modelos de tumor relevantes.

La invención, como se define en las reivindicaciones originales de la solicitud original, se explican en los siguientes párrafos:

1. Un método de tratamiento de un cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en combinación con capecitabina e ixabepilona, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β potencia la eficacia de capecitabina e ixabepilona para tratar dicho cáncer de mama.

2. El método del párrafo 1 precedente, en el que dicho antagonista de TGF β es un agente que bloquea la unión de una proteína de TGF β a su receptor.

3. El método del párrafo 2 precedente, en el que dicho agente es una proteína.

4. El método del párrafo 3 precedente, en el que dicho agente es un anticuerpo anti-TGF β .

5. El método del párrafo 4 precedente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-TGF β neutralizante de pan.

6. El método del párrafo 4 precedente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-TGF β .

7. El método del párrafo 6 precedente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una o más CDR de 1D11.

8. El método del párrafo 2 precedente, en el que dicha proteína de TGF β es TGF β -1, -2, -3, o una combinación de las mismas.

9. El método del párrafo 1 precedente, en el que dicho antagonista de TGF β es una molécula que es capaz de disminuir la actividad de un TGF β .
10. El método del párrafo 1 precedente, dicho antagonista de TGF β se co-administra con capecitabina, e ixabepilona.
- 5 11. El método del párrafo 1 precedente, dicho antagonista de TGF β se administra independientemente de la administración de capecitabina e ixabepilona.
12. El método del párrafo 1 precedente, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe el crecimiento de tumor primario.
- 10 13. El método del párrafo 1 precedente, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe la metástasis.
14. El método de la reivindicación 1, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe la metástasis de tumor primario al pulmón.
15. Un método de inhibición de un crecimiento tumoral asociado a cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método: administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en combinación con capecitabina e ixabepilona, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β potencia la eficacia de capecitabina e ixabepilona para inhibir dicho crecimiento tumoral asociado a cáncer de mama.
- 15 16. El método del párrafo 15 precedente, en el que dicho antagonista de TGF β es un agente que bloquea la unión de una proteína de TGF β a su receptor.
- 20 17. El método del párrafo 16 precedente, en el que dicho agente es una proteína.
18. El método del párrafo 17 precedente, en el que dicho agente es un anticuerpo anti-TGF β .
19. El método del párrafo 18 precedente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-TGF β neutralizante de pan.
20. El método del párrafo 18 precedente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-TGF β .
- 25 21. El método del párrafo 20 precedente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una o más CDR de 1D11.
22. El método del párrafo 16 precedente, en el que dicha proteína de TGF β es TGF β -1, -2, -3, o una combinación de las mismas.
- 30 23. El método del párrafo 15 precedente, en el que dicho antagonista de TGF β es una molécula que es capaz de disminuir la actividad de un TGF β .
24. El método del párrafo 15 precedente, dicho antagonista de TGF β se co-administra con capecitabina, e ixabepilona.
25. El método del párrafo 15 precedente, dicho antagonista de TGF β se administra independientemente de la administración de capecitabina e ixabepilona.
- 35 26. El método del párrafo 15 precedente, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe el crecimiento de tumor primario.
27. El método del párrafo 15 precedente, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe la metástasis.
- 40 28. El método del párrafo 15 precedente, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe la metástasis de tumor primario al pulmón.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de TGF β para su uso en un método de inhibición del crecimiento tumoral asociado a cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β potencia la eficacia de capecitabina e ixabepilona para inhibir dicho crecimiento tumoral asociado a cáncer de mama.
2. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de TGF β es un agente que bloquea la unión de una proteína de TGF β a su receptor.
3. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho agente es una proteína.
4. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 3, en el que dicho agente es un anticuerpo anti-TGF β .
5. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-TGF β neutralizante de pan.
6. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal anti-TGF β .
7. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una o más CDR de 1D11.
8. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 2, en el que dicha proteína de TGF β es TGF β -1, -2, -3, o una combinación de las mismas.
9. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de TGF β es una molécula que es capaz de disminuir la actividad de un TGF β .
10. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de TGF β se co-administra con capecitabina e ixabepilona.
11. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho antagonista de TGF β se administra independientemente de la administración de capecitabina e ixabepilona.
12. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 1, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe el crecimiento de tumor primario.
13. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 1, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe la metástasis.
14. El antagonista de TGF β para su uso según la reivindicación 1, en el que la administración de dicho antagonista de TGF β en combinación con capecitabina e ixabepilona inhibe la metástasis de tumor primario al pulmón.

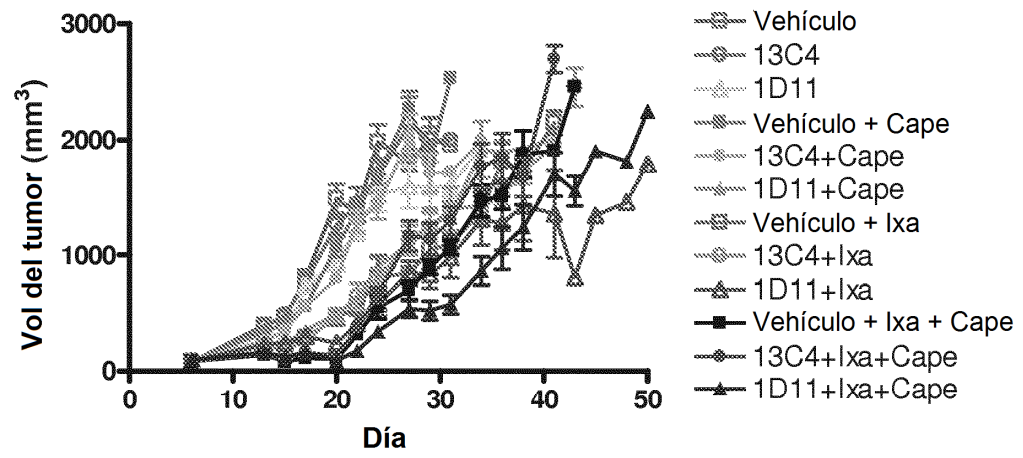


FIGURA 1

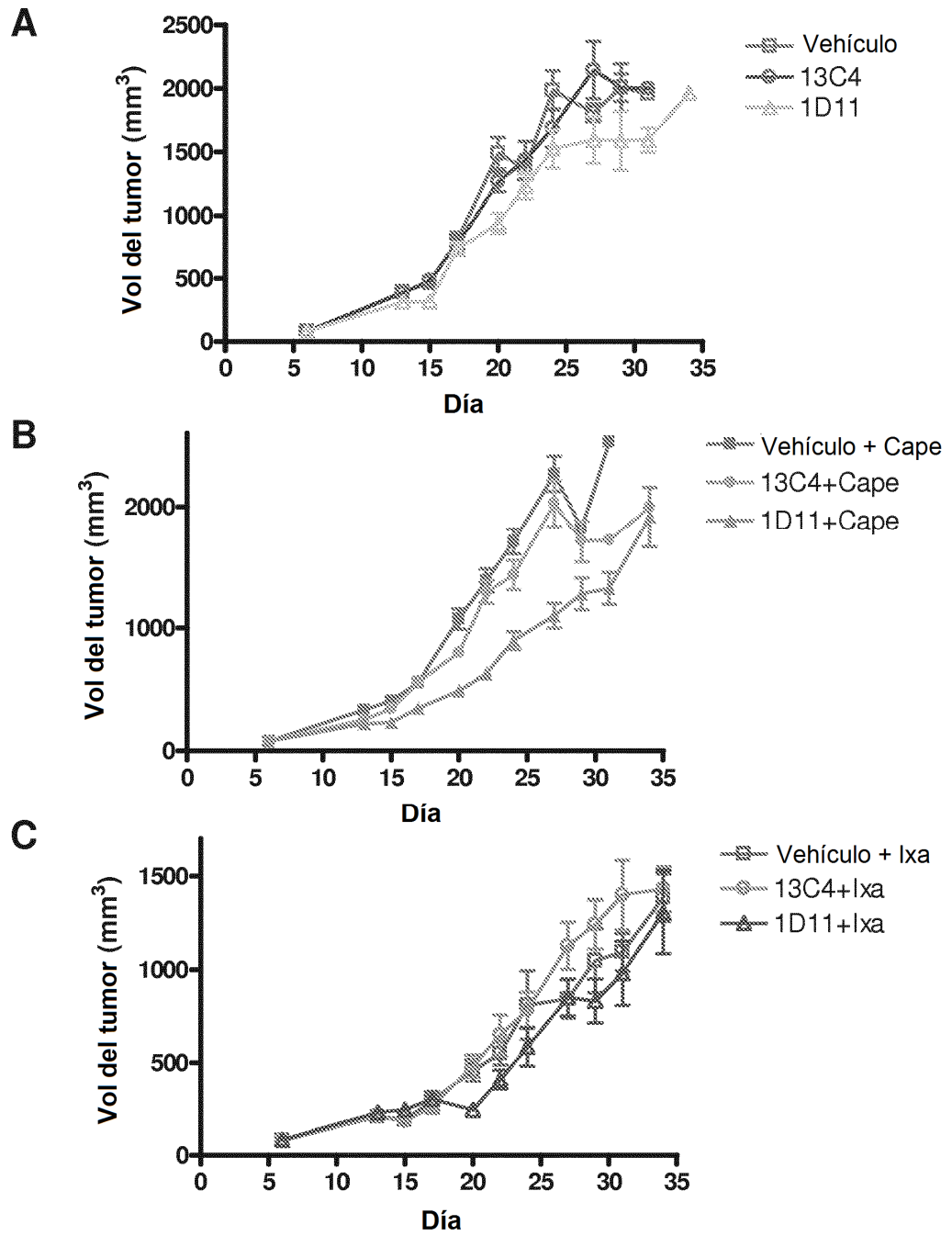


FIGURA 2

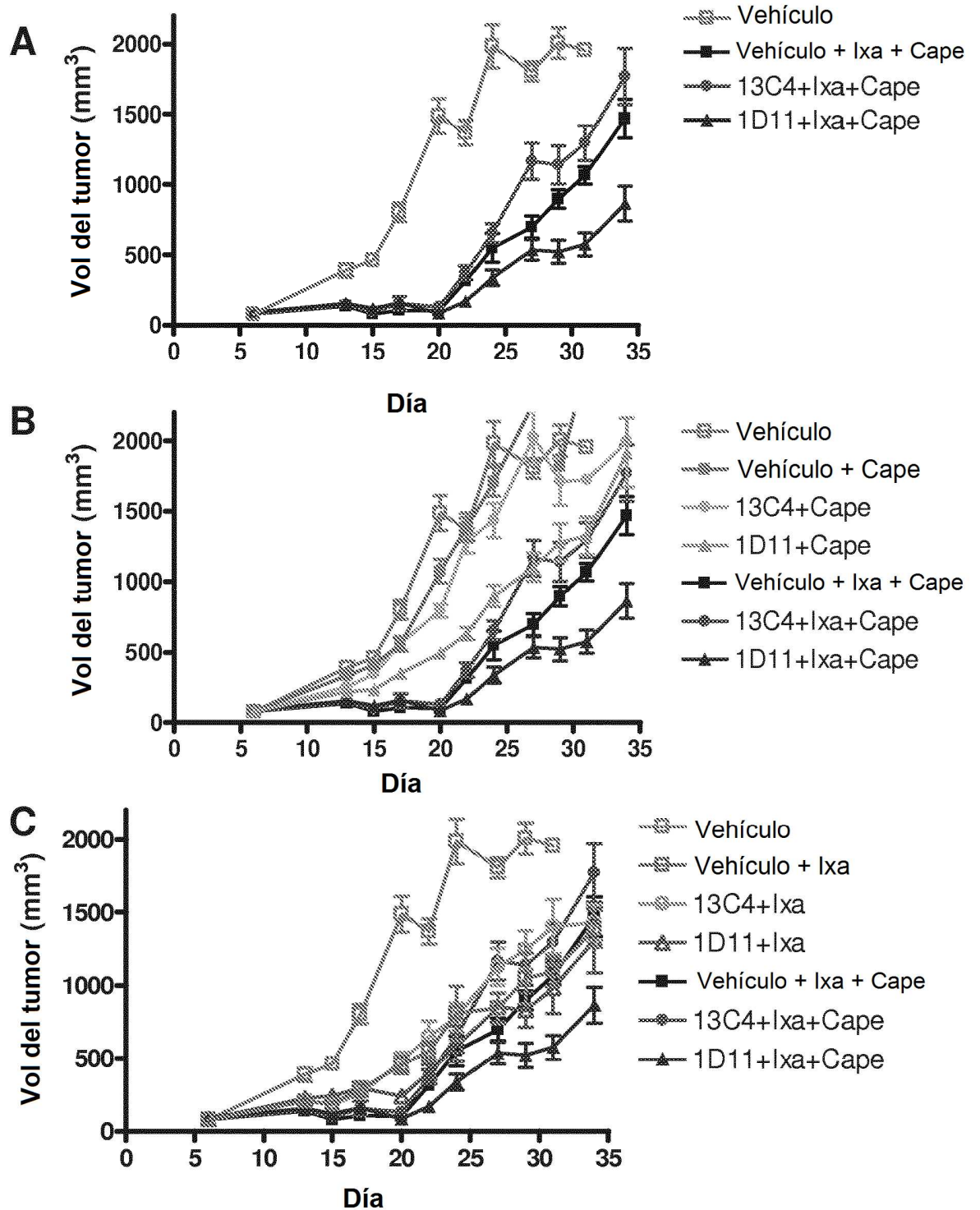


FIGURA 3

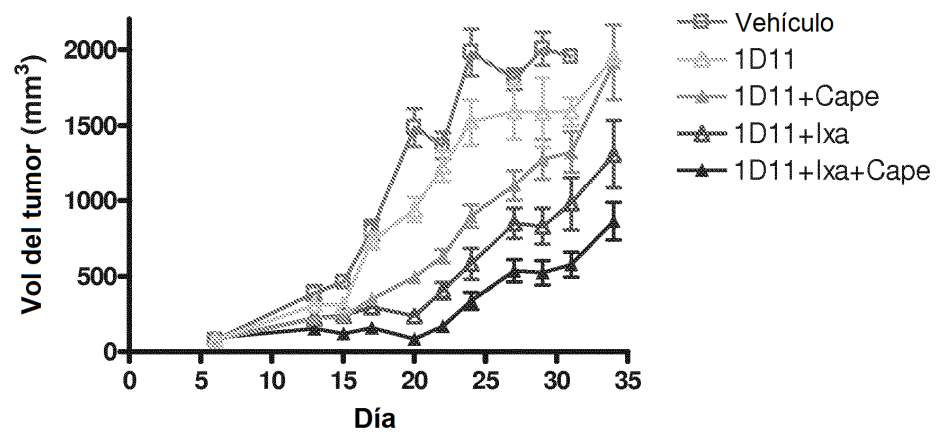


FIGURA 4

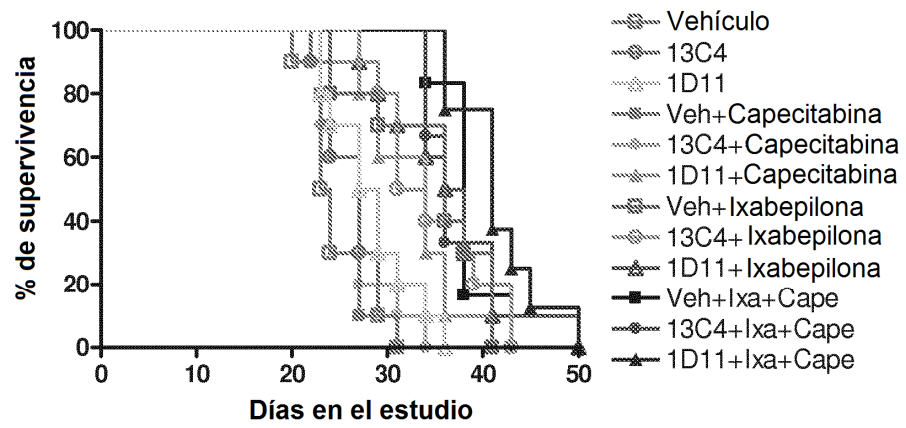


FIGURA 5

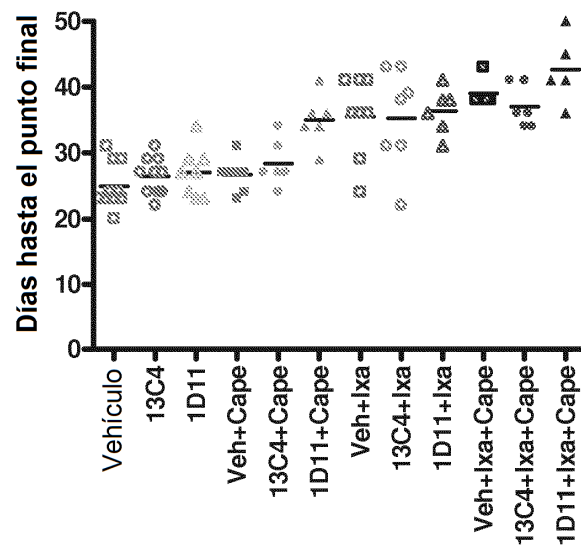


FIGURA 6

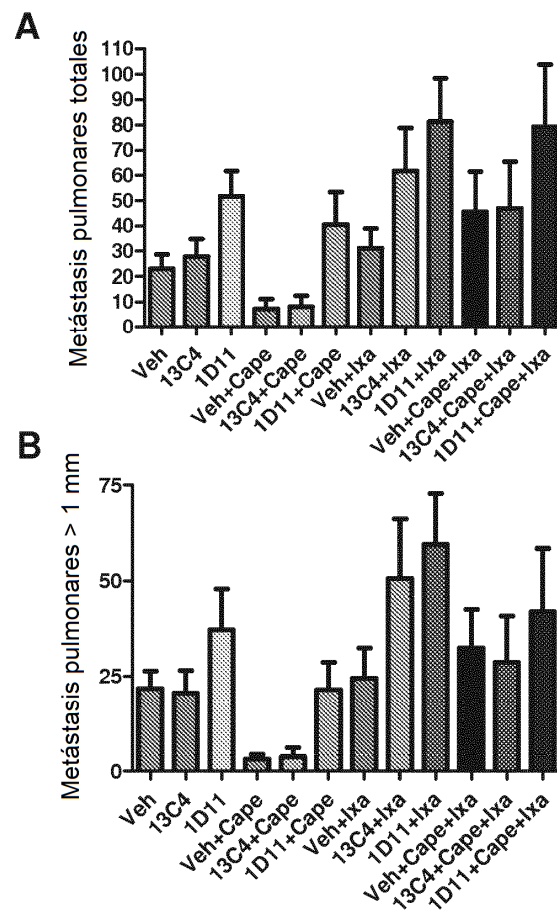


FIGURA 7

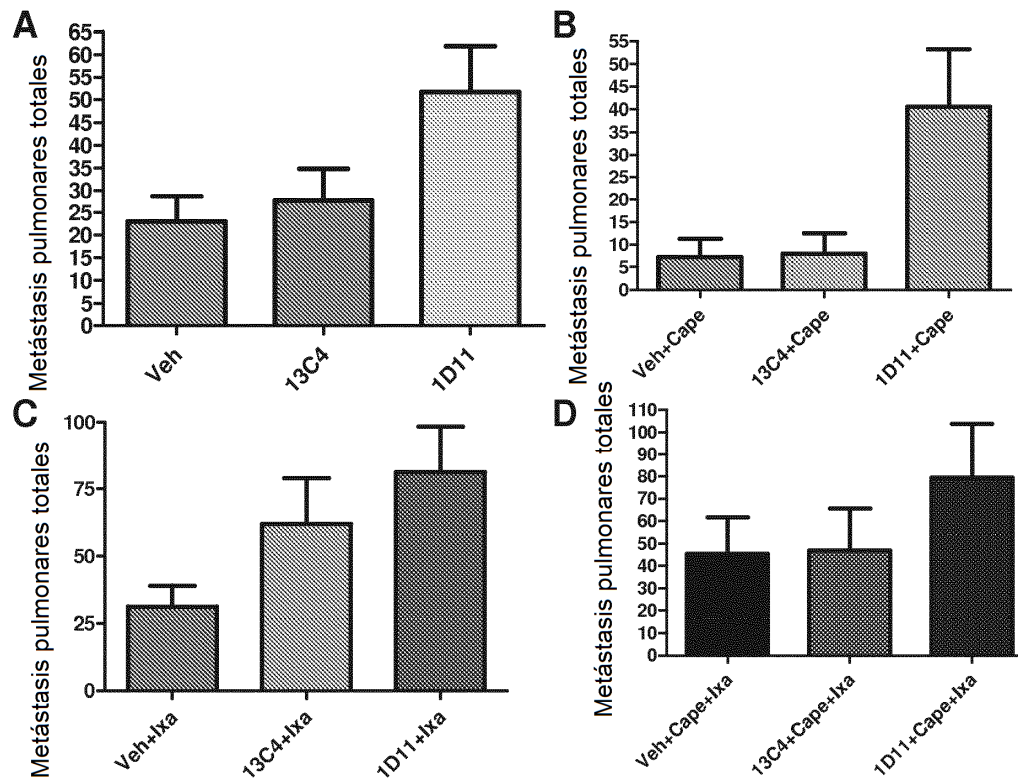


FIGURA 8

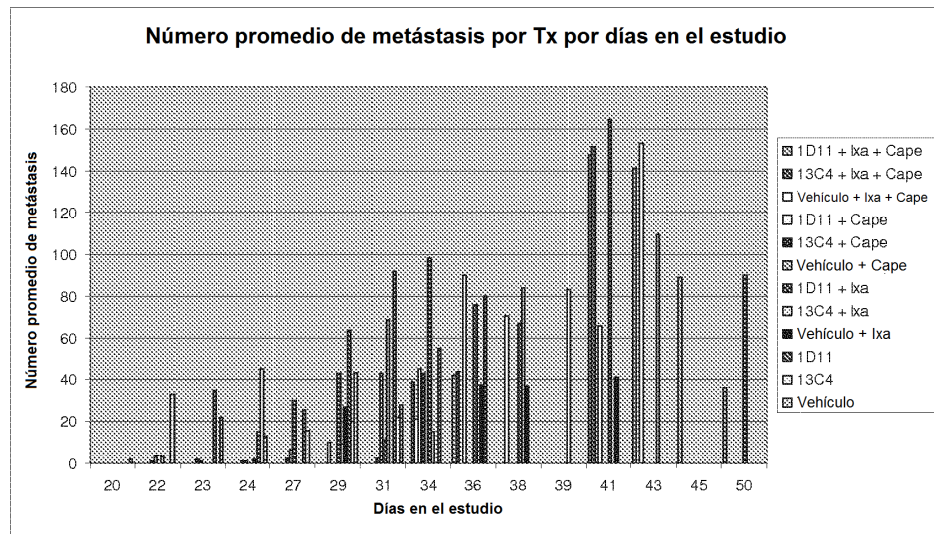


FIGURA 9

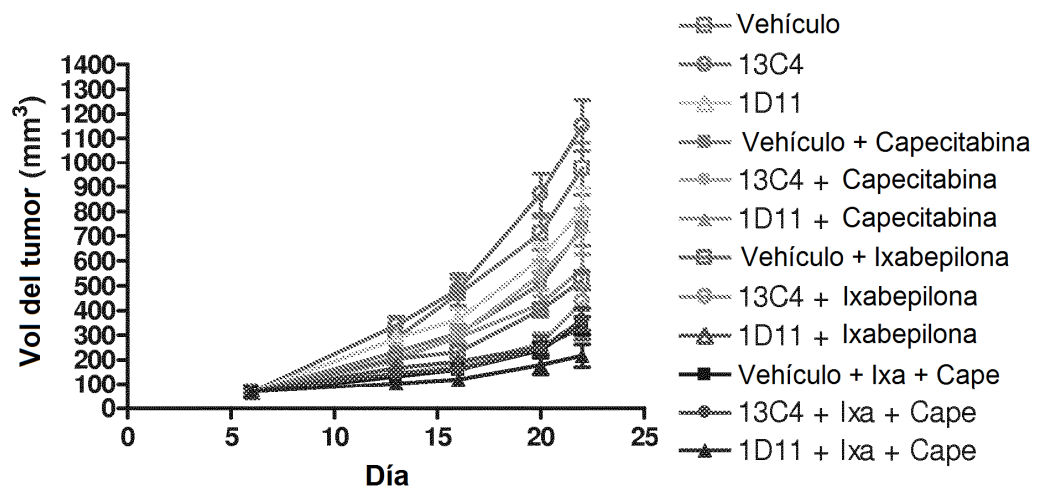


FIGURA 10

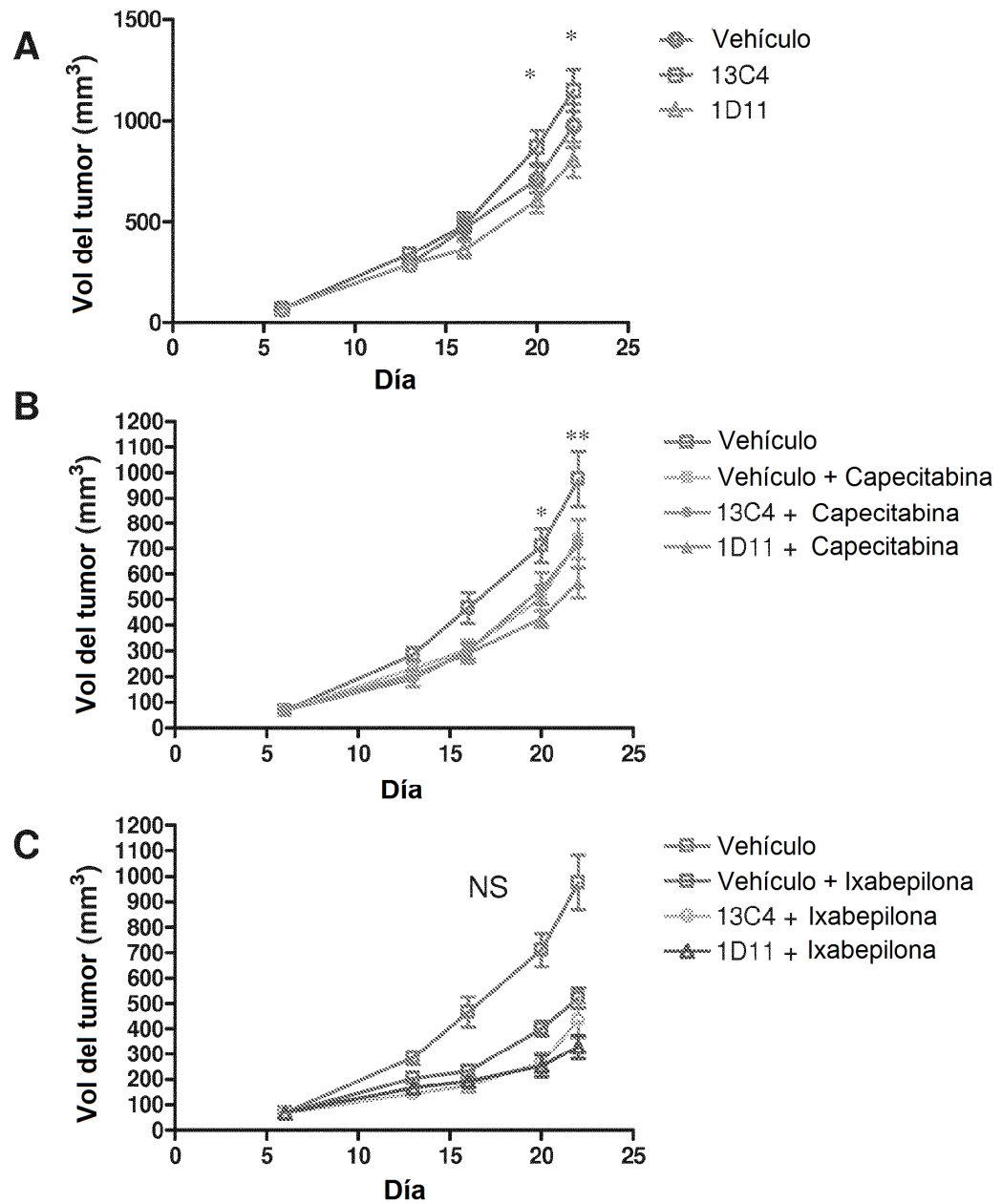


FIGURA 11

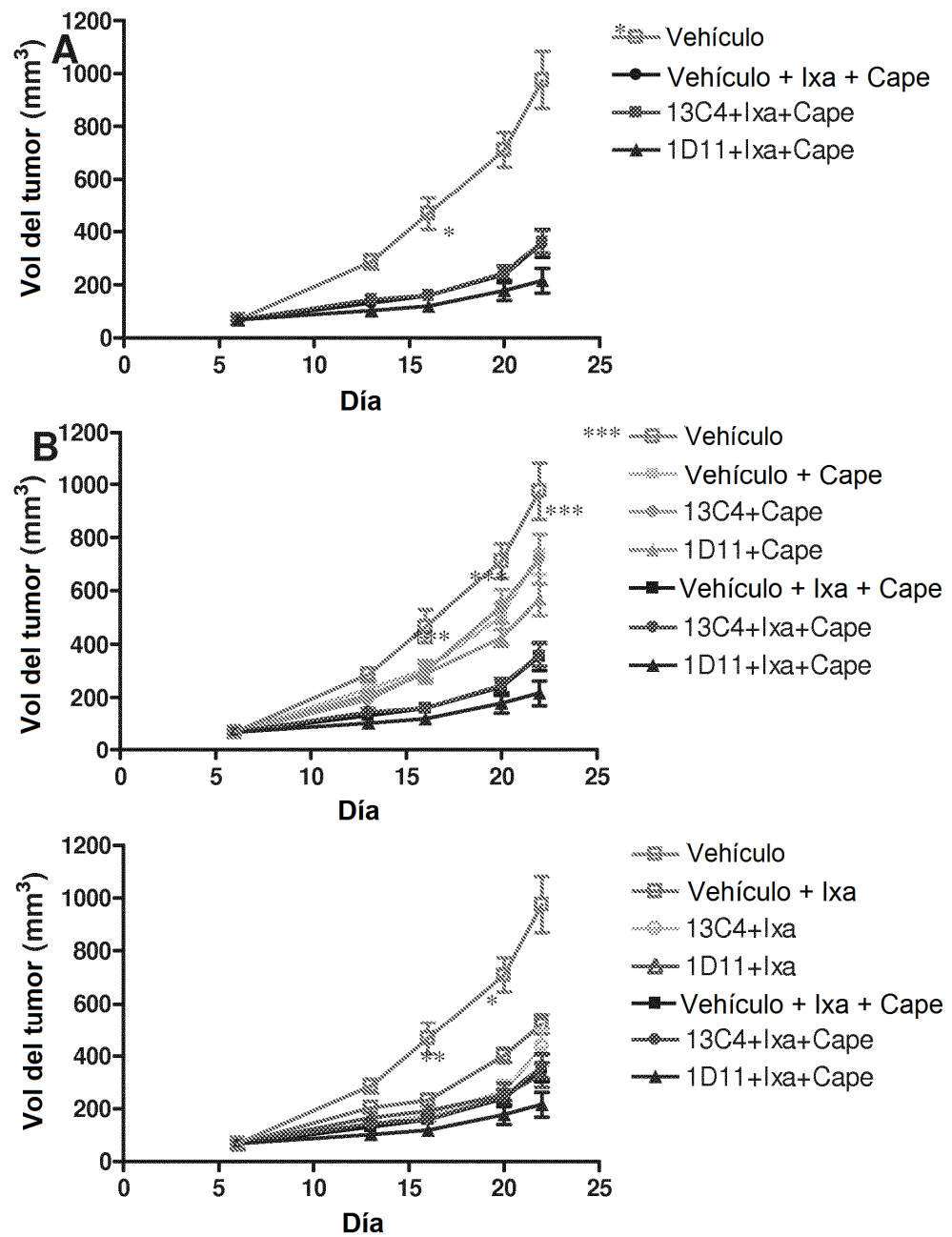


FIGURA 12

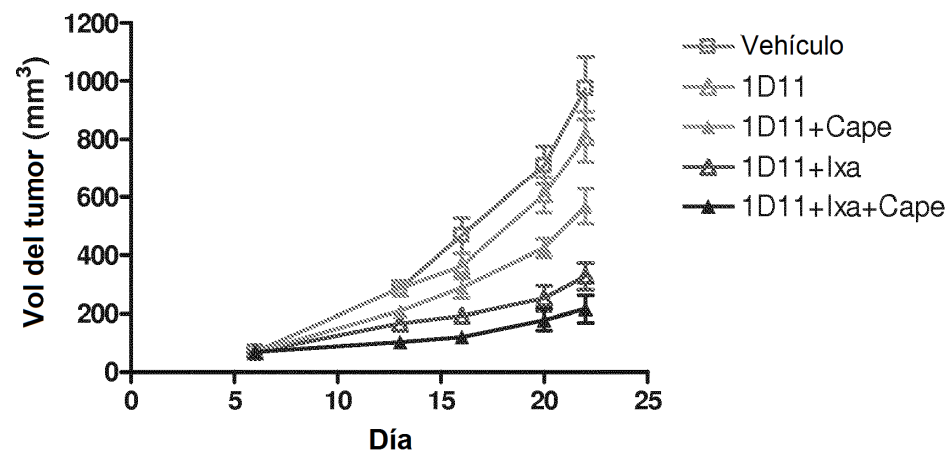


FIGURA 13

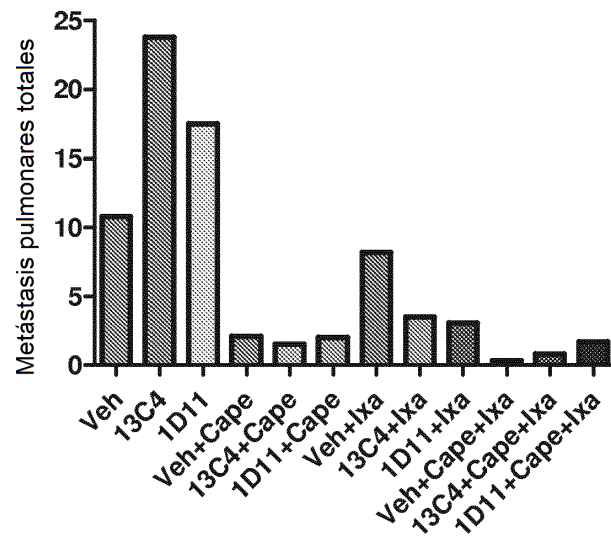
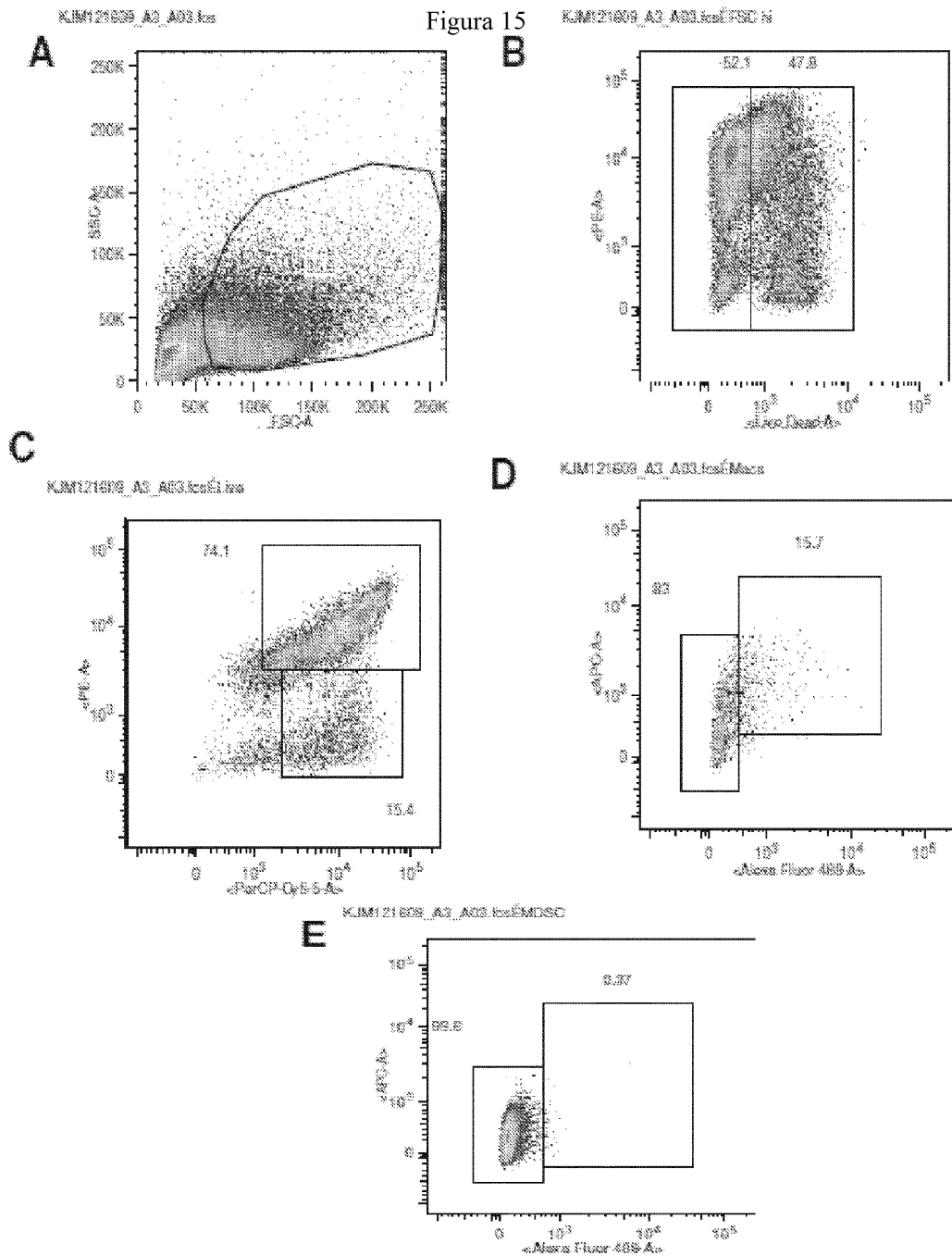


FIGURA 14

Figura 15



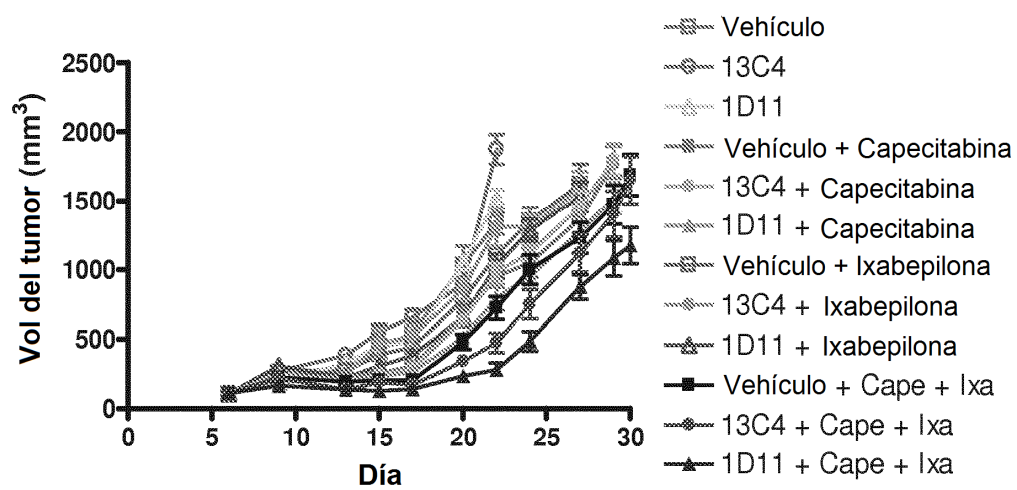


FIGURA 16

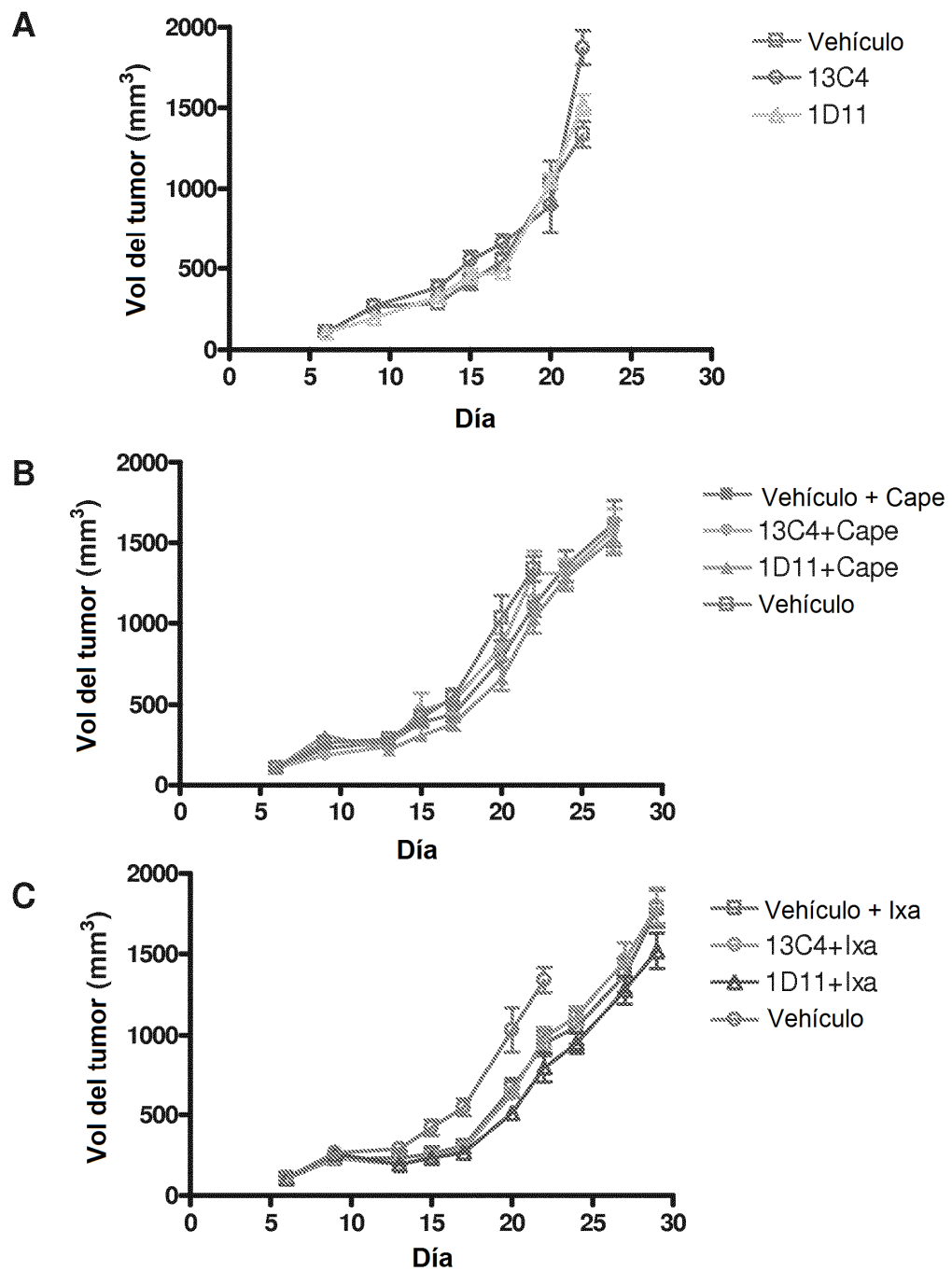


FIGURA 17

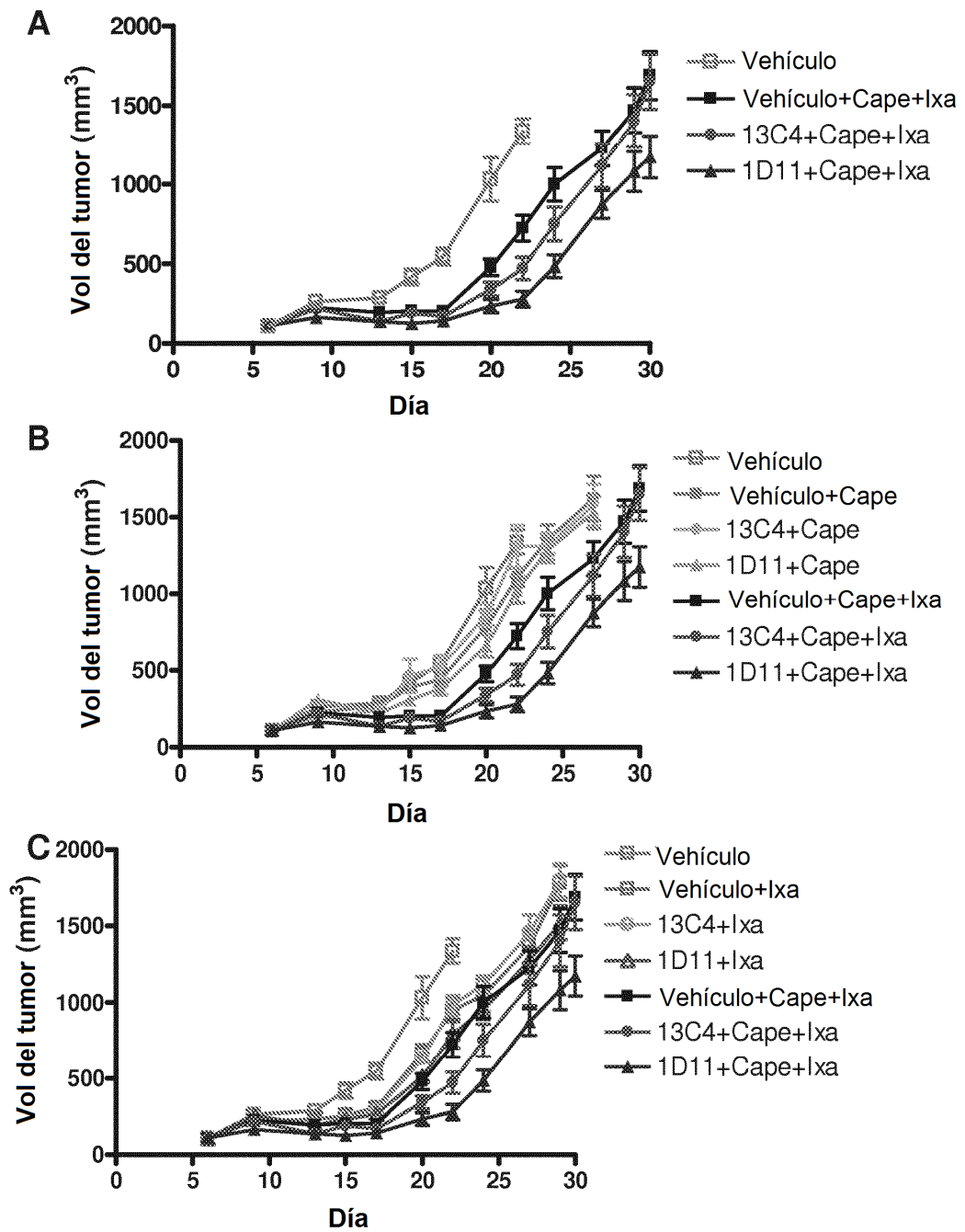


FIGURA 18

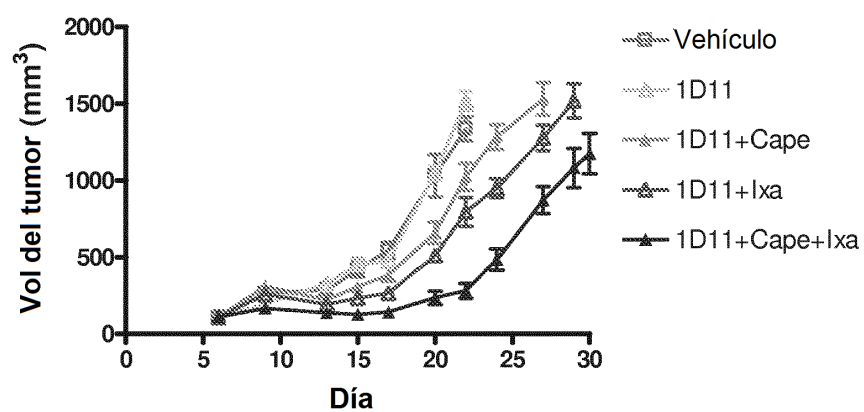


FIGURA 19

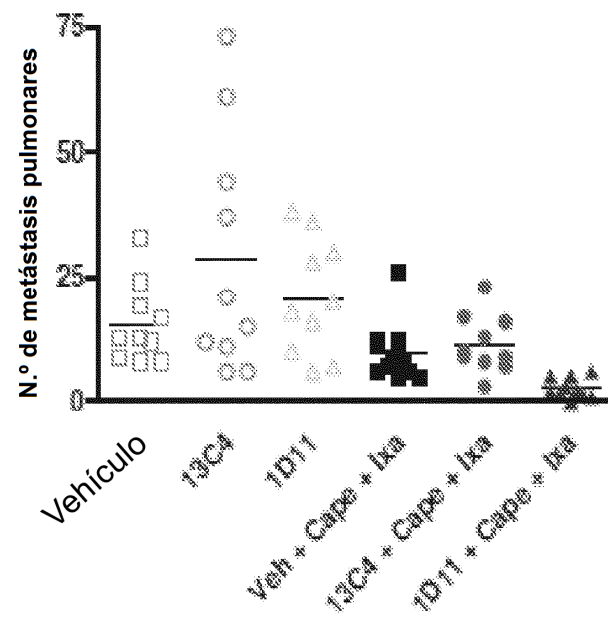


Figura 20

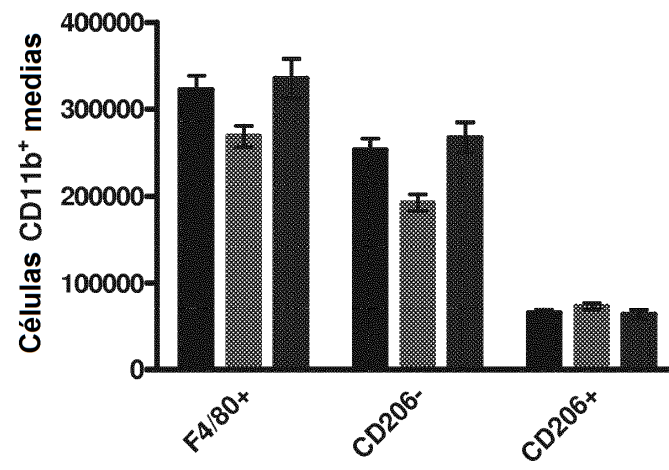


FIGURA 21

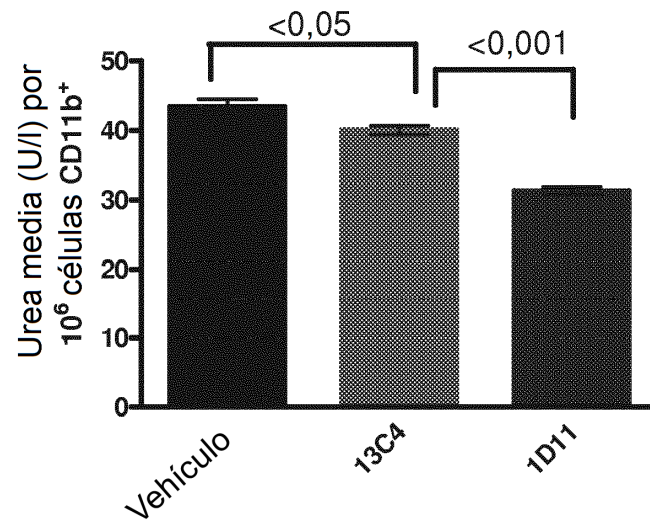


FIGURA 22