

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 532**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2012 PCT/US2012/030204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12129448**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2012 E 12760157 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2688585**

54 Título: **Métodos y composiciones para mejorar la terapia antiangiogénica con anti-integrinas**

30 Prioridad:

**23.03.2011 US 201161466791 P**

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

**11.02.2019**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**CARBONELL, WARREN, SHAWN y  
AGHI, MANISH, KUMAR**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 699 532 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

Métodos y composiciones para mejorar la terapia antiangiogénica con anti-integrinas

**Referencia al listado de secuencias, programa de computadora o disco compacto**

5 La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado en formato ASCII a través de EFS-Web. Dicha copia ASCII, creada el 31 de enero de 2012, se denomina "479-100 Sequence Listing.txt" y tiene un tamaño de 5,287 bytes.

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de las composiciones terapéuticas y la terapia para cáncer, incluyendo cáncer metastásico, especialmente terapia dirigida a la vascularización del tumor.

**Estado de la técnica**

15 A continuación, se presenta información de antecedentes sobre ciertos aspectos de la presente invención que pueden referirse a las características técnicas mencionadas en la descripción detallada, pero no necesariamente descritas en detalle. Es decir, las partes individuales o los métodos se pueden describir con mayor detalle en los materiales discutidos a continuación, los cuales pueden proporcionar una guía adicional a los expertos en la técnica para hacer o usar ciertos aspectos de la presente divulgación.

20 Se han identificado muchas moléculas que tienen propiedades angiogénicas. Sin embargo, la más potente identificada hasta la fecha es el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A). Esta es la diana del fármaco bevacizumab (también conocido como Avastin® Genentech, South San Francisco, CA) que es clínicamente prometedor en pacientes con varios cánceres de etapa tardía, incluyendo colon y recto [Hurwitz et al., *New England Journal of Medicine* 350: 2335-2342 (2004)], mama [Miller et al., *New England Journal of Medicine* 357: 2666 - 2676 (2007)], pulmón [Sandler et al., *New England Journal of Medicine* 355: 2542 - 2550 (2006)], riñón [Escudier et al., *The Lancet* 370: 2103 - 2111 (2007)] y cerebro [Friedman et al., *Journal of Clinical Oncology*, doi: 10.1200/JCO.2008.19.8721 (2009)]. Los fármacos diseñados contra los receptores de VEGF-A, a diferencia del propio VEGF-A, también se han mostrado igualmente prometedores en ensayos clínicos recientes.

25 Lucentis® (ranibizumab) es también un anticuerpo recombinante humanizado anti-VEGF. Ranibizumab se une a múltiples isoformas de VEGF-A. Como fragmento de anticuerpo, ranibizumab está diseñado para ser una molécula pequeña con un peso molecular de 48 kD. Está envasado para uso intravítreo, en lugar de uso intravenoso o intratumoral.

30 VEGF-A es el miembro más caracterizado y quizás el más potente de una familia de factores de crecimiento vascular [Ferrara y Gerber, *Acta Haematologica* 106: 148 - 156 (2002)].

Actualmente, otros miembros incluyen VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PIGF. Estos factores señalizan a través de al menos tres tirosinas quinasas receptoras conocidas: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3.

35 Desafortunadamente, las predicciones de la hipótesis anti-angiogénesis hasta ahora no se han cumplido en la clínica [Greenberg y Cheresch, *Expert Opinion on Biological Therapy* 9: 1347-1356 (2009)]. En el mejor de los casos, el tratamiento con bevacizumab en combinación con quimioterapia da como resultado una prolongación de la supervivencia en una mediana de solo 4.7 meses [Hurwitz et al., *New England Journal of Medicine* 350: 2335-2342 (2004)]. Los pacientes finalmente sucumben a la progresión continua del cáncer. El mecanismo de esta resistencia es controvertido y podría reflejar una invalidación de la hipótesis de la angiogénesis o la capacidad de las células tumorales para adquirir una fuente vascular alternativa.

40 Las estrategias de tratamiento en la técnica se han basado demasiado en un concepto singular de vascularización tumoral basado en la angiogénesis. Es bastante probable que la resistencia clínica a la terapia anti-angiogénesis se deba a que las células tumorales utilizan un método alternativo para obtener una vasculatura.

45 Se han descrito diversos tipos de procesos de vascularización tumoral incluyendo ectasia vascular, remodelación vascular, cooptación vascular, intususcepción vascular, formación de glomeruloides vasculares, formación de pseudo-vasos y progenitores endoteliales circulantes [revisado en Dome et al., *American Journal of Pathology* 170: 1. -15 (2007)].

50 Varias estrategias en la técnica han propuesto estrategias terapéuticas de combinación para la inhibición de la vascularización del tumor. Sin embargo, estas estrategias solo se dirigen al aspecto angiogénico de la vascularización tumoral o proponen la disrupción vascular dirigida de nuevos vasos tumorales. Hasta ahora, ninguna estrategia terapéutica en la técnica anterior proporciona la inhibición completa de la vascularización de tumores y/o metástasis mediante la administración a un sistema biológico de compuestos que se dirigen tanto a la señalización de crecimiento angiogénico como a la señalización de cooptación basada en la adhesión en combinación.

**Patentes y publicaciones específicas**

- 5 El documento WO 2010/111254 revela que el uso de un anticuerpo anti-VEGF junto con un anticuerpo anti-alfa5beta1 en un xenoinjerto de tumor de ratón se asocia con una carga tumoral reducida en comparación con ratones tratados con anti-VEGF a solas. Sin embargo, no se ha establecido ni sugerido la participación del componente integrina beta 1 en la angiogénesis.
- Park et al. (EE.UU. 7,618,627 emitida el 17 de noviembre de 2009, "Method of increasing radiation sensitivity by inhibition of beta-one integrin") utilizaron anticuerpo anti-integrina beta 1 AIB2 junto con radiación ionizante para aumentar la apoptosis de las células tumorales.
- 10 Theodore Yednock [Patente de EE. UU. 6,033,665 (2000)] "Compositions and methods for modulating leukocyte adhesion to brain endothelial cells". Esta es una de las primeras patentes que dan como resultado una terapia anti-integrina que ha sido aprobada por la FDA para uso clínico (Tysabri® contra alfa-4-beta 1 para el tratamiento de la esclerosis múltiple, Elan Pharmaceuticals, Inc.).
- Friess et al. [EE.UU. 2008/050385 A1 (2008)] propusieron un tratamiento de combinación con un anticuerpo anti-VEGF y un anticuerpo anti-HER2, ambos dirigidos contra factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis.
- 15 Senger et al. [Patente de EE.UU. 6,596,276 (2003)] propusieron la administración de anticuerpos inhibidores contra las subunidades de integrina alfa-1 y/o alfa-2 para dirigirse a estos efectores cursos abajo de la angiogénesis mediada por VEGF.
- Bissell et al. [Patente de EE.UU. 5,846,536 (1998) y Patente de EE.UU. 6,123,941 (2000)] describen un método para revertir el fenotipo maligno en un tejido administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo bloqueante de la función de integrina  $\beta_1$  o un inhibidor peptídico de la función integrina a los receptores de integrina  $\beta_1$  del tejido que necesita dicho tratamiento.
- 20

**Breve compendio de la invención**

- El siguiente breve compendio no pretende incluir todas las características y aspectos de la presente invención, ni implica que la invención deba incluir todas las características y aspectos discutidos en este compendio.
- 25 La presente invención se refiere, en general, a composiciones farmacéuticas para inhibir el crecimiento de células tumorales, que comprende: un primer agente que es un inhibidor de la actividad de VEGF, tal como la señalización de VEGF y/o la unión al receptor de VEGF; y un segundo agente que bloquea la integrina beta 1. El bloqueo de la integrina beta 1 puede ser el bloqueo de la unión celular, el bloqueo de la señalización intracelular de beta-integrina que se produce después de la unión de la célula, o ambas. Los agentes utilizados son composiciones de materia. Pueden ser anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos. La combinación de agentes tiene un efecto sinérgico, es decir, es más eficaz que cualquiera de los agentes por separado. Los agentes pueden estar en una única composición o un par de composiciones emparejadas.
- 30
- De acuerdo con la invención, se proporciona una combinación de un primer agente que es bevacizumab y un segundo agente que es un anticuerpo que se une específicamente a la integrina beta 1 asociada con cualquier subunidad alfa e inhibe la unión de células tumorales a un sustrato extracelular y bloquea la unión de integrina beta 1 para uso en el tratamiento de un cáncer.
- 35
- También se describen métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales. En general, tales métodos incluyen métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales, que comprenden la etapa de administrar a un sujeto que tiene dicho tumor: una combinación de un primer agente que es un agente antiangiogénico; y un segundo agente que bloquea las interacciones de células tumorales con la matriz extracelular mediada por integrina beta 1 y la señalización de integrina beta 1, por lo que el crecimiento de células tumorales se inhibe en mayor medida que la inhibición causada por el primer agente o el segundo agente solo, es decir, sinérgicamente. El sujeto puede ser un sujeto humano con un tumor.
- 40
- En una opción, el método comprende la administración de dosis de un anticuerpo de anti-integrina beta 1 junto con bevacizumab. Los métodos para el suministro de anticuerpos combinados a un paciente serán bien conocidos por las personas con habilidades ordinarias médicas, de enfermería o de salud relacionadas en el campo de la oncología clínica. Las presentes composiciones pueden administrarse por cualquier medio clínico, especialmente inyección parenteral o intratumoral. Las presentes composiciones también pueden aplicarse directamente a una cavidad real o potencial en el cuerpo, incluido el lecho tumoral después de la resección quirúrgica. Los agentes que aumentan la permeabilidad vascular también pueden administrarse en un intervalo clínicamente apropiado. Estos pueden mejorar la administración de productos terapéuticos en ciertos órganos, como el sistema nervioso central (SNC). Además, los regímenes de terapia adyuvante pueden administrarse antes, durante o después del tratamiento, incluyendo radioterapia y quimioterapia. Se pueden proporcionar administraciones repetidas para lograr el efecto clínico deseado.
- 45
- 50

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1A, 1B y 1C es una serie de tres gráficos de barras que muestran aumentos de la integrina beta 1 (MFI) de células de glioma U87MG (1A), células de carcinoma de mama MDA-MB-231 (1B) y células de carcinoma colorrectal SW1080 (1), respectivamente, en respuesta al insulto hipóxico agudo.

- 5 La Figura 2A y 2B es un par de fotografías que muestran la tinción de xenoinjertos de tumor de glioma para la expresión de integrina beta 1 con (2A) y sin (2B) tratamiento con bevacizumab.

La Figura 3A es un gráfico de barras que muestra la expresión de integrina beta 1 en células de glioma U87MG en diferentes condiciones de proliferación; la Figura 3B es un gráfico de dispersión que muestra la correlación entre la expresión de integrina beta 1 y la proliferación.

- 10 Las Figuras 4A y 4B son un par de fotografías de una muestra de paciente de glioblastoma multiforme que muestra células teñidas para la expresión de integrina beta 1 donde hay una vasculatura normal (4A) y en vasos glomeruloides angiogénicos (4B).

La Figura 5 es un gráfico de barras que representa la expresión de integrina beta 1 en casos de glioblastoma primario y glioblastoma evasivo antiangiogénico.

- 15 La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la inhibición del crecimiento celular mediante diferentes dosis de AIB2 en una línea celular de glioblastoma primaria y la inhibición del crecimiento sinérgico cuando se combina AIB2 con hipoxia (1% de oxígeno durante 48 horas).

- 20 Las Figuras 7A y 7B son un par de gráficos de barras que muestran la expresión de la integrina beta 1 (7A) y la proliferación (7B) de tres líneas celulares *knockdown* (con silenciamiento génico) diferentes, donde el *knockdown* de integrina beta 1 mostró sustancialmente menos expresión y proliferación.

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra la expresión de anexina y marcadores de apoptosis Ki67 a diferentes concentraciones de AIB2 en una línea celular de glioblastoma resistente a anti-angiogénesis.

La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra el crecimiento celular bajo diferentes concentraciones de anticuerpo AIB2 de la línea celular primaria de GBM.

- 25 La Figura 10 es un gráfico que muestra cambios en el volumen tumoral bajo diferentes tratamientos de anticuerpos en un modelo de tumor de ratón. La gráfica etiquetada como "combo" es una combinación de AIB2 y bevacizumab. La flecha muestra el inicio del tratamiento.

- 30 La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra el crecimiento celular a lo largo del tiempo de células de GBM en fase de crecimiento y cultivo confluyente (detención del crecimiento) que se trataron con diferentes concentraciones de AIB2 durante 2 días. IgG se usó como control.

La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra el crecimiento celular a lo largo del tiempo de células de GBM sometidas a hipoxia durante 2 días seguido de crecimiento en normoxia. Las células recibieron IgG (control) y diferentes concentraciones de AIB2.

- 35 La Figura 13 es un gráfico de líneas que muestra el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo para tumores de glioma U87MG medido quincenalmente con IgG de control (10 mg/kg) (diamantes), bevacizumab (10 mg/kg) (cuadrados), o terapia combinada de baja dosis alternante de bevacizumab (1 mg/kg) y AIB2 (1 mg/kg) (círculos).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA**

**Definiciones**

- 40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y técnicas de, biología y química celular y molecular son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Ciertas técnicas experimentales, no definidas específicamente, se realizan  
45 generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Para efectos de claridad, los siguientes términos se definen a continuación.

- 50 "VEGF" se refiere al factor de crecimiento endotelial vascular, también denominado factor de crecimiento vasoendotelial, que tiene una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo en el Número de Acceso Genbank AAA35789, descrito adicionalmente en Leung, et al. "Vascular endotelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen", Science 246 (4935), 1306-1309 (1989). VEGF es una glicoproteína de 46 kDa dimérica, unida a disulfuro, relacionada con el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas ("PDGF"). Se produce por líneas celulares normales

y líneas de células tumorales; es un mitógeno selectivo de células endoteliales; muestra actividad angiogénica en sistemas de prueba *in vivo* (por ejemplo, córnea de conejo); es quimiotáctico para células endoteliales y monocitos; e induce activadores de plasminógeno en células endoteliales que están implicados en la degradación proteolítica de la matriz extracelular durante la formación de capilares. Se conocen varias isoformas de VEGF que, si bien muestran actividad biológica comparable, difieren en el tipo de células que las secretan y en su capacidad de unión a heparina. Los receptores celulares de VEGF (VEGFRs) son receptores transmembranosos de tirosina quinasa. Se caracterizan por un dominio extracelular con siete dominios de tipo inmunoglobulina y un dominio de tirosina quinasa intracelular. Se han caracterizado varios tipos de receptor de VEGF, incluyendo VEGFR-1 (también conocido como ft-1), VEGFR-2 (también conocido como KDR3) y VEGFR-3. Una gran cantidad de tumores humanos, especialmente gliomas y carcinomas, expresan altos niveles de VEGF y VEGFRs. Esto ha llevado a la hipótesis de que el VEGF liberado por las células tumorales estimula el crecimiento de los capilares sanguíneos y la proliferación del endotelio tumoral de una manera paracrina y, a través del suministro mejorado de sangre, acelera el crecimiento tumoral.

El término “inhibidor de VEGF” se refiere a una sustancia o método que disminuye la señalización por la vía VEGF-VEGFR. Los inhibidores de VEGF pueden ser, por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas, incluyendo más específicamente anticuerpos, incluyendo anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-VEGFR, intracuerpos, maxicuerpos, minicuerpos, diacuerpos, proteínas de fusión a Fc tales como pepticuerpos, recepticuerpos, proteínas y fragmentos de receptores de VEGF solubles, y una variedad de otros. Un inhibidor de VEGF actualmente preferido es un péptido, tal como un inhibidor basado en anticuerpos. Muchos inhibidores de VEGF actúan uniéndose a VEGF o a un receptor de VEGF. Otros trabajan más indirectamente al unirse a factores que se unen a VEGF o a un receptor de VEGF o a otros componentes de la vía de señalización de VEGF. Aún otros inhibidores de VEGF actúan alterando las modificaciones postraduccionales reguladoras que modulan la señalización de la vía de VEGF. Los inhibidores de VEGF de acuerdo con la invención también pueden actuar a través de mecanismos más indirectos. Cualquiera que sea el mecanismo implicado, como se usa en el presente documento, un inhibidor de VEGF disminuye la actividad efectiva de la vía de señalización de VEGF en una circunstancia dada sobre lo que sería en la misma circunstancia en ausencia del inhibidor. Otro inhibidor de VEGF se basa en ácido nucleico, usando RNAi, como se describe a continuación.

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

La expresión “administración mejorada por convección” se refiere a un método para administración de fármacos al cerebro mediante la superación de la barrera hematoencefálica. La administración mejorada por convección fue descrita por primera vez por R. Hunt Bobo et al. en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Marzo de 1994, Vol 91, páginas 2076-2080; “Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain”). La administración mejorada por convección implica la colocación estereotáctica a través de orificios de trepanación craneal de varios catéteres en el parénquima cerebral y la posterior infusión de agentes terapéuticos a través de una bomba de microinfusión. Los métodos estándar de administración local de la mayoría de los medicamentos al cerebro, ya sea por inyección intravenosa y paso a través de la barrera hematoencefálica, o inyección intraventricular, se han basado en la difusión, lo que resulta en una distribución no homogénea de la mayoría de los agentes. La administración intravenosa de medicamentos al cerebro se ve obstaculizada por la barrera hematoencefálica, que impide el paso de moléculas grandes. La barrera hematoencefálica se caracteriza por uniones estrechas entre las células endoteliales vasculares, que evitan o impiden que varias sustancias naturales y sintéticas (incluyendo medicamentos contra el cáncer) entren en el cerebro. En contraste con las técnicas que dependen de la difusión, la administración mejorada por convección usa un gradiente de presión establecido en la punta de un catéter de infusión para empujar un fármaco hacia el espacio extracelular. La intención es distribuir el medicamento de manera más uniforme, a mayores concentraciones, y en un área más grande que cuando se administra por difusión sola. La administración de agentes terapéuticos mejorada por convección puede ocurrir después de la craneotomía con resección tumoral. La administración de fármacos mejorada por convección se describe en detalle por Yael Mardor et al. en *Cancer Research* (agosto de 2005, vol 65, páginas 6858-6863; “Convection-enhanced drug delivery: Increased efficacy and magnetic resonance monitoring”).

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a un anticuerpo sustancialmente libre de secuencia no humana (por ejemplo, ratón). Puede ser completamente humano, o humanizado, como se conoce en la técnica, mediante la

eliminación de secuencias de ratón, excepto las regiones de unión del anticuerpo, ya sea la parte Fv o las regiones CDR.

El término “anticuerpo” incluye además diversas formas de anticuerpos modificados o alterados, tales como diversos fragmentos tales como un fragmento Fv, un fragmento Fv que contiene solo las regiones variables de cadena ligera y pesada, un fragmento Fv unido por un enlace disulfuro (Brinkmann, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 547-551 (1993)), un fragmento Fab o (Fab)<sup>2</sup> que contiene las regiones variables y partes de las regiones constantes, un anticuerpo monocatenario y similares. (Bird et al., Science 242: 424 - 426 (1988); Huston et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883 (1988)). El anticuerpo puede ser originalmente de origen animal (especialmente ratón o rata) o humano o puede ser quimérico (Morrison et al., Proc Nat. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)). Se puede humanizar como se describe en Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986), y en la solicitud de patente del Reino Unido publicada N° 8707252.

El término “sustrato extracelular” se refiere a un sustrato para unión celular, y puede incluir tanto tejido definido tal como vasculatura (células endoteliales vasculares) o matriz extracelular (MEC), es decir, la parte extracelular del tejido animal que generalmente proporciona soporte estructural para las células animales además de realizar otras funciones importantes; se compone de una malla entrelazada de proteínas fibrosas y glicosaminoglicanos.

El término “shRNA” se refiere a RNA de horquilla corta.

El término “RNAi” se refiere a RNA de interferencia. El RNAi es una técnica de silenciamiento génico post-transcripcional dirigida que usa RNA bicatenario (dsRNA) para degradar el RNA mensajero (mRNA) que contiene la misma secuencia que el dsRNA (Sharp, PA y Zamore, PD 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D, et al. Cell 101, 25 - 33 (2000). Tuschl, T. et al., Genes Dev. 13, 3191 - 3197 (1999); Cottrell TR, y Doering T L. 2003. Trends Microbiol., 11: 37 - 43; Bushman F. 2003. Mol Therapy., 7: 9 - 10; McManus, MT y Sharp P, A., 2002. Nat Rev Genet, 3: 737 - 47). El proceso se produce cuando una ribonucleasa endógena escinde el dsRNA más largo en RNA más cortos, por ejemplo, de 21 o 22 nucleótidos de longitud, denominados RNA interferentes pequeños o siRNAs. Los segmentos de RNA más pequeños median la degradación del MRNA diana. Los kits para la síntesis de RNAi están disponibles en el mercado a partir de, por ejemplo, New England Biolabs o Ambion. Una o más de las químicas descritas en este documento para uso en RNA antisentido pueden emplearse en moléculas que median RNAi.

El término “composición farmacéutica” se refiere a un producto o par de productos que contienen los agentes terapéuticos citados en una cantidad específica en combinación con diluyentes, estabilizantes, excipientes, etc. farmacéuticamente aceptables. El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son de suficiente pureza y calidad para usar en la formulación de una composición farmacéutica, medicina o medicamento para uso en la presente invención y que, cuando se administra de manera apropiada a un animal o un humano, no produce una reacción adversa, alérgica u otra reacción inadecuada. Dado que tanto el uso humano como el uso veterinario se incluyen igualmente dentro del alcance de la presente invención, una formulación farmacéuticamente aceptable incluiría una composición farmacéutica, medicina o medicamento para uso humano o veterinario.

En ciertos aspectos de la presente divulgación relativa a métodos, una composición farmacéutica puede contener un único agente, pero, de acuerdo con el método, se puede administrar durante un curso de tratamiento, con el otro agente.

### Métodos y materiales generales

Aquí se describen métodos y composiciones mejorados para tratar tumores y metástasis que reconocen los mecanismos duales de vascularización tumoral mediante 1) nuevo crecimiento o remodelación de vasos (es decir, angiogénesis) en combinación con 2) utilización de vasos existentes a través de interacciones adhesivas directas (es decir, cooptación). Al inhibir ambos mecanismos en un sistema biológico en combinación, los tumores y las metástasis pueden verse privados de un aporte sanguíneo adecuado que da como resultado la detención del crecimiento de las células tumorales y posiblemente la regresión, incluyendo la muerte de las células tumorales. Los métodos tienen una variedad de usos en la investigación científica y la atención de la salud en los que la vascularización es un factor que contribuye a los procesos de enfermedad, especialmente el cáncer. En otra realización, la potenciación de la vascularización para la reparación o el reemplazo del tejido se puede lograr potenciando la angiogénesis y la cooptación del vaso adhesivo simultáneamente o secuencialmente.

Las terapias antiangiogénicas actuales dirigidas a la vía VEGF son un mercado en rápido crecimiento liderado por Avastin® de Genentech (bevacizumab) con ventas totales de \$ 6100 millones en 2009. Sin embargo, Avastin® solo ha demostrado un éxito clínico modesto. En el mejor de los casos, aumenta la supervivencia general en 4.7 meses en el cáncer de colon y la supervivencia libre de progresión en 4.2 meses en cáncer cerebral (glioblastoma multiforme, GBM). Aún más desalentador, la FDA está considerando anular su aprobación para el uso de Avastin® en el cáncer de mama metastásico, como ya ocurrió en el Reino Unido.

Se cree que Avastin® funciona impidiendo la formación de nuevos vasos (angiogénesis), privando así a las células tumorales de glucosa y oxígeno. Notablemente, la integrina beta 1 está regulada positivamente durante la privación de oxígeno (también conocida como hipoxia) en células tumorales. En las células de GBM tomadas de pacientes que

han fallado en el tratamiento con Avastin®, este objetivo está regulado positivamente de 50 a 200 veces en comparación con las células de GBM primarias no tratadas. Curiosamente, también se regula positivamente durante el proceso de proliferación de células tumorales y después de la irradiación gamma, lo que sugiere un doble papel en la mitosis y la supervivencia celular. La inhibición de este objetivo también puede prevenir la invasión dependiente de integrina de células tumorales sobre andamios (*scaffolds*) de ECM (por ejemplo, estroma y membranas basales vasculares).

Un aspecto de la presente invención implica el uso de agentes que inhiben la integrina beta 1 en pacientes que han fallado el tratamiento con anticuerpos anti-VEGF, tales como Avastin® (bevacizumab). Esto se ha demostrado *in vitro* como se describe a continuación, e *in vivo*. La frase “tratamiento con anticuerpo anti VEGF fallido” se usa aquí en su sentido clínico. La definición clínica de falla de bevacizumab es: 1) la falta de respuesta desde el inicio (por lo general, 70% de los pacientes) y 2) progresión de la enfermedad ante la terapia después de la respuesta inicial. Existen varios criterios clínicos objetivos para la progresión, pero el más utilizado (y específicamente utilizado en los ensayos clínicos de Bevacizumab) son los Criterios McDonald. En general, los pacientes de ambos grupos son retirados de Bevacizumab y luego reintervenidos (28 días después, dado que Bevacizumab los hace propensos a sangrados) y enviados para posibles terapias de tercera línea o atención al final de la vida. Por lo tanto, se cree que las composiciones anti-beta 1 pueden ser una monoterapia para GBM 3L que han fallado Bevacizumab.

### Cooptación vascular

Holash et al. (1999; Science 284: 1994-1998 “Vessel co-option, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF”) demostraron en el modelo de glioma de rata que un subconjunto de tumores inicialmente creció mediante la cooptación de vasos sanguíneos hospedadores existentes. Esta vasculatura hospedadora cooptada mostró a su debido tiempo una regulación positiva de VEGF y angiogénesis. Los estudios del presente inventor sobre metástasis cerebrales han demostrado que la cooptación vascular o la utilización de vasos preexistentes es la forma predominante de uso de vasos por células tumorales durante el establecimiento inicial de metástasis cerebrales experimentales y en muestras clínicas humanas que reflejan estadios tempranos de la enfermedad. Los hallazgos excluyen un requisito para la angiogénesis de *novo* antes de la formación de microcolonias. El parénquima del SNC está en gran parte desprovisto de componentes de la membrana basal estromal no vascular que son necesarios para la adhesión y supervivencia de las células epiteliales y de carcinoma. La cooptación vascular, por lo tanto, suministra sustratos para el crecimiento maligno de células de carcinoma no neurales que de otro modo no estarían ampliamente disponibles en el neurópilo.

La proliferación por células tumorales metastásicas está altamente potenciada tras la adhesión a un sustrato de la membrana basal y se atenúa inhibiendo MEK *in vitro*. De acuerdo con los experimentos en cultivo de tejidos, durante las primeras etapas de la formación de colonias *in vivo*, la gran mayoría de las micrometástasis se encontraron en contacto directo con la VBM de los vasos cerebrales existentes y muchas de estas células estaban proliferando. Por lo tanto, la membrana basal vascular (VBM) está implicada como sustrato activo para el crecimiento de células tumorales en el cerebro. La VBM promovió la adhesión y la invasión de células malignas y fue suficiente para el crecimiento del tumor antes de cualquier evidencia de angiogénesis.

### El papel de las integrinas beta 1 en la cooptación vascular

Se ha encontrado que la adhesión de las células tumorales a la membrana basal vascular de los vasos sanguíneos está mediada por la integrina beta 1. El bloqueo o la pérdida de la subunidad de integrina beta 1 en las células tumorales impidió la adhesión a la membrana basal vascular y el establecimiento y crecimiento de metástasis atenuadas *in vivo*. La necesidad de células de carcinoma metastásico para la vasculatura en la adhesión y la invasión durante la metástasis en el cerebro puede ser más análoga a la necesidad de VBM durante el desarrollo de los islotes pancreáticos. Las células de los islotes usan integrinas  $\beta 1$  para interactuar con la VBM y esta interacción es necesaria para la proliferación y la función endocrina. Nikolova et al. denominaron a este microambiente de membrana basal un “nicho vascular” (Nikolova et al., 2006; Dev Cell 10: 397-405; “The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and beta cell proliferation”). De forma similar, las células murales vasculares requieren la subunidad de integrina  $\beta 1$  para la adhesión adecuada a los vasos y para mantener la estabilidad del vaso. De forma análoga, las células de carcinoma parecen secuestrar la VBM del cerebro para funciones esenciales durante la metástasis cerebral. Curiosamente, la inhibición de la angiogénesis en metástasis de melanoma del SNC circunscrito y bien establecido provoca la reversión al crecimiento por cooptación vascular. Esto sugiere un continuo para la utilización de vasos por células tumorales que puede representar un objetivo viable para la explotación terapéutica.

La interacción entre las células tumorales y los vasos se basa en la adhesión de células tumorales mediadas por integrina  $\beta 1$  a la membrana basal vascular de los vasos sanguíneos. Esta interacción es suficiente para promover la proliferación inmediata y el establecimiento de micrometástasis de líneas tumorales en el cerebro. El mecanismo angiogénico fue universal para ambos carcinomas (células dependientes de anclaje) y linfomas (células dispensables de anclaje) en el SNC. Las integrinas  $\beta 1$  desempeñan un papel dominante en muchas facetas de la biología celular normal y se han implicado en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer. Existen al menos 10 heterodímeros de integrina  $\beta 1$  que sirven como receptores adhesivos variablemente promiscuos para diversos ligandos como los colágenos y las lamininas. Sin embargo, nuestros datos sugieren que el antagonismo de la subunidad de integrina  $\beta 1$  sola podría ser útil en estrategias terapéuticas para metástasis cerebrales. En efecto, Park et al. encontraron que la

inhibición de anticuerpos anti-subunidad de integrina  $\beta 1$  indujo la apoptosis en células de carcinoma de mama que crecieron en cultivo tridimensional, pero no en células cultivadas en monocapas (Park et al. 2006; “ $\beta 1$  integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and *in vivo*,” *Cancer Res.* 66: 1526-1535). El tratamiento de ratones que portan xenoinjertos de cáncer de mama de esas líneas celulares con el mismo anticuerpo condujo a la disminución del volumen tumoral. Además del mecanismo apoptótico descrito *in vitro*, la inhibición de la cooptación vascular también puede haber atenuado el crecimiento. En una estrategia alternativa para evaluar el papel de las integrinas  $\beta 1$ , se analizaron los tumores en el modelo transgénico MMTV/PyMT de cáncer de mama. La delección condicional de integrina  $\beta 1$  después de la inducción de tumorigénesis dio como resultado un deterioro de la fosforilación y proliferación de FAK consistente con la dependencia de la señalización dependiente de anclaje para el crecimiento tumoral.

El presente método es aplicable para el tratamiento de cualquier tipo de tumor de mamífero epitelial o no epitelial con receptores de integrina beta 1, en particular, glioblastoma, astrocitoma anaplásico, carcinomas de seno/mamas, carcinomas de pulmón, melanomas, carcinomas de colon y recto, carcinomas de vejiga, carcinomas de endometrio, carcinomas de ovario, carcinomas renales, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, carcinomas pancreáticos, carcinomas de próstata y carcinomas de tiroides.

Por lo tanto, una ventaja de este aspecto es que ambos mecanismos de vascularización tumoral que comprenden la angiogénesis y la cooptación de los vasos adhesivos están dirigidos. Como se describe a continuación, una ventaja de la inhibición de la integrina beta 1 no es solo bloquear la cooptación de los vasos sanguíneos para el uso de un tumor, sino también inhibir directamente la proliferación tumoral y prevenir las vías de señalización de supervivencia activadas por la hipoxia. Esto evita la resistencia terapéutica identificada en las estrategias de la técnica anterior que se basan únicamente en la anti-angiogénesis sola. Los medios para la evaluación de la eficacia del tratamiento, que incluyen la latencia y la regresión del tumor, serán bien conocidos por los expertos en medicina ordinaria. Estos incluirán el uso de técnicas de imágenes médicas como la MRI, CT, PET y SPECT, así como las mediciones del tamaño físico y el estado clínico del paciente. Las dos modalidades de agente antiangiogénico y agente bloqueador de integrina juntas tienen un efecto sinérgico.

Los anticuerpos anti-integrinas, y, en particular, integrina  $\beta 1$ , útiles en la práctica de los presentes métodos, son conocidos en la técnica. Ver Bissell et al. Patente de EE.UU. N° 6,123,941 para una descripción de la reversión del fenotipo maligno en células cancerosas mediante la aplicación del anticuerpo anti-integrina  $\beta 1$  AIB2. Las anti-integrinas beta 1 contra el epítipo CD-29 están disponibles en Research Diagnostics, Inc., Flanders, N. J. Otro anticuerpo anti-integrina  $\beta 1$  es CSAT, disponible en el Banco de Hibridomas de la Universidad de Iowa. Otro anticuerpo anti-integrina  $\beta 1$  comercialmente disponible es 4B7R, un anticuerpo IgG1 kappa murino disponible de Ancell Immunology Research Products.

AIB2 es una IgG1 monoclonal de rata que se aisló originalmente a partir de un hibridoma de coriocarcinoma humano, y se identificó como un anticuerpo anti-integrina  $\beta 1$  que no se une específicamente a todos los heterodímeros del dominio extracelular de la integrina  $\beta 1$ . Los experimentos que utilizan fragmentos F(ab)' de AIB2 digerido con enzima indicaron que la porción de unión al epítipo del anticuerpo era activa, y dieron como resultado una modulación a la baja de la señalización mediada por integrina  $\beta 1$  y de los intermedios de señalización curso abajo. Detalles adicionales sobre la biología de la integrina  $\beta 1$  se vuelven más complejos por 5 variantes de corte y empalme conocidas que difieren principalmente con respecto al dominio citoplasmático, que se describen adicionalmente a continuación en relación con polipéptidos para inmunización en la preparación de un anticuerpo de integrina anti- $\beta 1$ . Se ha descubierto que AIB2 reconoce todas las variantes a través del dominio extracelular. Park et al (EE.UU. 7,618,627 publicada el 17 de noviembre de 2009, “Method of increasing radiation sensitivity by inhibition of beta-one integrin 1”) utilizaron el anticuerpo AIB2 junto con radiación ionizante para aumentar la apoptosis de las células tumorales.

Como se informa en Hall et al., “The alpha 1/beta 1 and Alpha 6/beta – 1 Integrin Heterodimers Mediate Cell Attachment to Distinct Sites on Laminin”, *J. Cell Biol.* 110: 2175 - 2184 (1990), el anticuerpo anti-integrina AIB2 se preparó de la siguiente manera: se administró a una rata Lewis dos inyecciones intraperitoneales separadas 2 semanas con 107 células de coriocarcinoma JAR cosechadas con EDTA, mezcladas 1: 1 con adyuvante Ribi. 2 semanas después, dos inyecciones intraesplénicas adicionales se administraron con 2 semanas de diferencia en ausencia de adyuvante. Se administró a un ratón Balb/c cuatro inyecciones intraperitoneales bimensuales de  $5 \times 10^6$  citotrofoblastos humanos del primer trimestre. 4 días después de la última inyección, cada bazo se fusionó con células de plasmacitoma de ratón Sp2/0 por el método de Kennett et al. (1980), modificado por Wheelock et al. (1987). Los sobrenadantes de hibridoma se seleccionaron por su capacidad para inhibir la unión de células de coriocarcinoma humano JAR a FN, LN o Col IV usando el ensayo de unión descrito anteriormente. Se encontraron dos sobrenadantes de hibridoma de rata que inhibieron la unión a FN solamente (BIE5 y BIIIG2), mientras que otros dos inhibieron la unión a LN, FN y Col IV (AIB2 y BIEII). Un sobrenadante de hibridoma de ratón inhibió la unión de células JAR a Col IV solamente (S2G3). Estos hibridomas se clonaron por dilución limitante. Los anticuerpos de rata se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía de afinidad usando agarosa anti-rata de cabra. El sobrenadante de ratón, S2G3, una IgM, se concentró 10 veces por precipitación con sulfato de amonio saturado al 50% a 4 °C. Estos anticuerpos se volvieron a analizar para determinar la actividad inhibidora de la unión en los sustratos revestidos con FN, LN y Col IV antes del uso posterior.

Un anticuerpo anti-integrina adecuado para uso con el presente método y composición puede producirse mediante métodos similares a los descritos en Werb, Z., Tremble, P., Berensten, O., Crowley, E., y Damsky, CH (1989). Signal transduction through the fibronectin receptors induces collagenase expression. *J. Cell Biol.* 109, 877-890; y Damsky, C. H., Fitzgerald, M., y Fisher, S. J. (1992). Esto proporciona un ensayo de detección de anticuerpos potenciales. El inmunógeno usado fue células de coriocarcinoma de JAR humano completo. El anticuerpo bloquea la unión de las células a Fn, Col-I, IV y LN, y así se puede caracterizar de esta manera.

La inhibición de la integrina beta 1 con el anticuerpo monoclonal de rata AIB2 combinado con hipoxia redujo sinérgicamente el crecimiento de células de GBM *in vitro*. AIB2 también redujo directamente el crecimiento de células de GBM evasivas a Avastin® *in vitro*. Dicha composición también podría usarse para la formación de imágenes de tumores *in vivo* o como un biomarcador para la proliferación celular o respuestas a insultos celulares (por ejemplo, hipoxia o radiación ionizante). También se observó una sorprendente regulación positiva de la integrina beta 1 en vasos sanguíneos angiogénicos de GBM no tratado. Por lo tanto, también puede ser útil para inhibir directamente y/o formar imágenes del proceso de angiogénesis *in vivo*.

Una variedad de inhibidores de VEGF se describen en este documento. Como se describe en el documento de Oliner et al. EE.UU. 2009/0304694 A1, publicado el 10 de diciembre de 2009, titulado "ANG2 AND INHIBITOR COMBINATIONS", los inhibidores de VEGF incluyen lo siguiente: (a) 4TBPPAPC, como se describe en el documento US2003/0125339 o en la patente de EE.UU. N° 6,995,162, particularmente en partes que describen 4TBPPAPC; (b) AMG 706, como se describe en el documento US2003/0125339 o en la patente de EE.UU. N° 6,995,162 o la patente de los EE.UU. No. 6,878,714, particularmente en partes que describen AMG 706; (c) Avastin®; (d) Nexavar®, como se describe en WO00/42012, WO00/41698, US2005/0038080A1, US2003/0125359A1, US2002/0165394A1, US2001/003447A1, US2001/0016659A1, y US2002/013774A1, particularmente en partes que describen Nexavar®; (e) PTK/ZK; (f) Sutent®, y (g) inhibidores de VEGF de fórmula IV como se describe en el documento US2006/0241115.

Los anticuerpos humanizados anti-integrina se pueden preparar de acuerdo con varios métodos. El documento EE.UU. 6,949,245 de Sliwkowski et al., publicado el 27 de septiembre de 2005, titulado "Humanized anti-ErbB2 antibodies and treatment with anti-ErbB2 antibodies", describe métodos para humanizar un anticuerpo que puede adaptarse de acuerdo con las presentes enseñanzas. Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente 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 pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N° 4,816,567 y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de la región constante humana.

Como se describe adicionalmente en el documento de EE.UU. 6,949,245 mencionado anteriormente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323 - 327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de EE.UU. N° 4,816,567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de regiones hipervariables y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

También se pueden usar anticuerpos recombinantes de cadena simple, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5,840,300 de Williams et al., titulada "Methods and compositions comprising single chain recombinant antibodies", a los que se hace referencia con el fin de describir métodos útiles en la preparación de tales composiciones. Brevemente, las cadenas de inmunoglobulina Kappa, pesada y lambda se amplifican por separado y se combinan posteriormente como cadenas simples, usando PCR recombinante, es decir, el método de PCR de empalme por extensión de solapamiento (SOE), en el que las cadenas simples comprenden una cadena pesada más una cadena kappa o una cadena pesada más una cadena lambda. Se usan péptidos de enlaces lineales flexibles en los cebadores (*primers*) que, por lo tanto, comprenden el enlazador (*linker*) utilizado para unir V<sub>L</sub> a V<sub>H</sub> para formar los nuevos fragmentos Fv recombinantes que contienen regiones variables de unión a integrina que comprenden tanto cadenas ligeras como pesadas como una única cadena. Los fragmentos Fv pueden desarrollarse como una biblioteca de fragmentos Fv dirigidos contra las subunidades de integrina β1.

Los anticuerpos adecuados también pueden prepararse en ratones genéticamente modificados diseñados para expresar anticuerpos humanos. Los ratones se pueden inmunizar con un antígeno que comprende un fragmento de integrina β1 humana y los esplenocitos de ratón que contienen células B activas fusionadas con una línea de mieloma adecuada. Los ratones con el repertorio de Ig humana están disponibles comercialmente. Véase Hemachandra et al.,

“Human Monoclonal Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Derived from Transgenic Mice Containing Megabase Human Immunoglobulin Loci Are Opsonic and Protective against Fatal *Pseudomonas* Sepsis”, INFECTION AND IMMUNITY, abril de 2001, p. 2223-2229 vol. 69, N° 4.

5 Otra técnica para preparar los presentes anticuerpos, la tecnología de biblioteca combinatoria de presentación en fagos, proporciona un método útil para generar grandes bibliotecas de Mabs humanos que pueden seleccionarse para la actividad anti-integrina. Las bibliotecas hechas a partir de mRNA de linfocitos pueden consistir en hasta 10<sup>8</sup> recombinantes de repertorios de Fab monoclonales. Exponiendo la biblioteca en una superficie de fago filamentosos y seleccionando un epítipo modelo (fragmento de integrina β1 como se describe a continuación), los anticuerpos Fab monoclonales se pueden seleccionar y analizar para determinar sus propiedades inmunológicas y actividades biológicas (inhibición de integrina). Los Fab son ideales para usarse tanto en métodos terapéuticos como de diagnóstico, ya que pueden producirse en grandes cantidades de forma económica y son innatamente no inmunogénicos. Ver la patente de los EE. UU. N° 6,716,410 de Witzum et al. para una descripción de esta técnica.

10 Como se describe por Marks et al., se puede aislar un Fv de cadena sencilla humana (scFv) a partir de una biblioteca de fagos no inmune que se une al antígeno β1. Entonces, la CDR3 de la región variable de cadena ligera (V(L)) y pesada (V(H)) de un anticuerpo seleccionado puede mutarse secuencialmente, mostrarse el scFv mutante en el fago y seleccionar mutantes de afinidad más alta en el antígeno. Véase Schier et al., “Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site”, J Mol Biol. 1996, Nov. 8; 263 (4): 551-67.

15 También se pueden emplear anticuerpos biespecíficos (por ejemplo, diacuerpos) que se entrecruzan con otros antígenos. A diferencia de otros formatos biespecíficos, los diacuerpos pueden producirse en forma funcional por secreción de bacterias (*E. coli*) o levaduras (*P. Pastoris*). Los protocolos detallados se pueden encontrar en: Tomlinson I. y Holliger P. (2000) Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments, *Methods Enzymol*, 326, 461-479; y Holliger, P. (2001) Expression of antibody fragments in *Pichia pastoris*. *Meth. Mol. Biol.* Los fragmentos de anticuerpos diméricos, o minicuerpos, pueden crearse en una variedad de formas conocidas. Estos producen dímeros no covalentes o covalentes (sc(FV)<sub>2</sub>). La presente composición de anticuerpo puede prepararse como una composición farmacéutica purificada con estabilizantes y excipientes conocidos en un polvo estéril o en forma líquida para administración intravenosa como se conoce en la técnica y se ejemplifica en la descripción de un anticuerpo monoclonal liofilizado en la patente de EE.UU. N° 6,165,467.

20 El término “sinérgico” se usa en este documento en su sentido convencional, refiriéndose a una combinación de componentes en donde la actividad de la combinación es mayor que el aditivo de las actividades individuales de cada componente de la combinación.

25 Otros inhibidores de la actividad de VEGF se describen en este documento. Por ejemplo, Aflibercept (VEGF-Trap, AVE-0005) es una proteína de fusión recombinante totalmente humana compuesta del segundo dominio Ig del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1) y el tercer dominio Ig del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), fusionado a la región Fc de IgG1 humana. Aflibercept se une a todas las isoformas de VEGF-A, así como al factor de crecimiento placentario (PlGF), evitando así que estos factores estimulen la angiogénesis. Aflibercept se administra por infusión intravenosa a 4 mg/kg cada dos semanas en combinación con quimioterapia.

30 Una proteína de unión al receptor de VEGF, designada KDR-bp (proteína de unión a KDR), del veneno de Boca de Algodón Oriental (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) es un homólogo de PLA2 catalíticamente inactivo, Lys49PLA2, que posee miotoxicidad potente, y es una molécula exógena que antagoniza el receptor de VEGF, como se describe en Fujisawa et al. “Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region”, *Biochem. J.* (2008) 411, 515 - 522.

35 En ciertos aspectos, la presente invención puede usarse en un método para inhibir el crecimiento de células tumorales, que comprende la etapa de administrar a un sujeto que tiene dicho tumor una combinación de un primer agente de baja dosis que es bevacizumab; y un segundo agente que es un anticuerpo que bloquea la unión de células tumorales mediada por integrina beta 1, por lo que el crecimiento de células tumorales se inhibe a una cantidad equivalente como la causada por el primer agente a una dosis clínica más alta. El primer agente de dosis baja puede ser, por ejemplo, bevacizumab que se administra en una dosis mínima como se indica en el etiquetado o la literatura del producto. De acuerdo con la presente invención, el crecimiento del tumor se inhibirá al menos en la misma medida que si bevacizumab se administrara a la dosis más alta aprobada. Por ejemplo, la dosis recomendada de bevacizumab en el tratamiento del cáncer de colon o recto es de 5 mg o 10 mg por kg (aproximadamente 2.3 mg a 4.5 mg por libra) administrados por vía IV cada 14 días. La dosis recomendada variará (5 o 10 mg por kg) según el tipo de quimioterapia administrada.

55 **Combinaciones terapéuticas de un agente que es un inhibidor de VEGF y un agente que bloquea beta - integrina**

Los agentes que modulan la cooptación del vaso adhesivo y la angiogénesis se pueden administrar juntos o secuencialmente después de un intervalo de tiempo prescrito. Cuando se administran juntos, se pueden administrar a

través de una plataforma de administración biocompatible aceptable. Este puede ser un nanoconjugado o polímero. Alternativamente, los agentes pueden fusionarse directamente entre sí. Además, se pueden administrar agentes moduladores de angiogénesis múltiple y/o cooptación de vasos adhesivos simultáneamente o secuencialmente. Finalmente, cualquiera de las realizaciones puede ser combinada con terapias adyuvantes como radiación, quimioterapia y/o agentes que aumentan la permeabilidad vascular.

Se pueden utilizar las realizaciones para inhibir el aspecto de señalización de la angiogénesis que tiene un efecto inhibitorio sobre VEGF-A, ya sea en la señalización curso abajo o en la capacidad para unirse a sus receptores extracelulares (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Fik-1). Otros mediadores de la angiogénesis también pueden ser dirigidos, incluyendo otros miembros de la familia VEGF (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF) y sus receptores (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR2/Fik-1, VEGFR-3/Flt-4), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1 y FGF-2) y sus receptores (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR4), miembros del factor de crecimiento epidérmico (EGF y HB-EGF) y su receptor (EGFR), CEACAM-1/CD-66a, el receptor huérfano HER-2, angiopoyetinas (Ang1, Ang2, Ang3 y Ang4) y sus receptores (Tie-1 y Tie2), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y sus receptores (PDGFR tipo alfa y PDGFR tipo beta), factor de crecimiento transformante - miembros de la familia beta (TGF-beta 1, TGFbeta2, TGF-beta3) y su receptor (TGFBR2), ligando de tipo delta 4 y su receptor (Notch), y fragmentos antiangiogénicos de origen natural de proteínas estructurales preexistentes tales como angiostatina y tumstatina.

Se pueden usar realizaciones para dirigir el aspecto de señalización de cooptación del vaso adhesivo que tiene un efecto inhibitorio sobre la integrina beta 1, ya sea en la señalización curso abajo o en la capacidad de unirse a sus receptores extracelulares. Estos pueden incluir desintegrinas, componentes/fragmentos de matriz extracelular, quinasa de adhesión focal (FAK), no quinasa relacionada con FAK y quinasa relacionada con señal extracelular (ERK/MAPK).

Las composiciones antiangiogénicas pueden comprender un anticuerpo monoclonal humano o fragmento de anticuerpo, anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo, péptido inhibitorio, inhibitorio de quinasa, inhibitorio endógeno, inhibitorio de molécula pequeña, nanocuerpo, RNAi, aptámero, antisentido, o cualquiera de estos agentes en combinación con un vector o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de cooptación de vasos basadas en anti-adherencia pueden comprender un anticuerpo monoclonal humano o fragmento de anticuerpo, anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo, péptido inhibitorio, inhibitorio de quinasa, inhibitorio endógeno, inhibitorio de molécula pequeña, nanocuerpo, RNAi, aptámero, antisentido, o cualquiera de estos agentes en combinación con un vector o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una opción que usa la invención, un paciente con glioblastoma multiforme recurrente (GBM) se someterá a la implantación de uno o más catéteres colocados intratumoralmente, dentro de una cavidad de resección, o subduralmente. Al paciente se le administrará la terapia estándar de bevacizumab I.V. a una dosis e intervalo clínicamente apropiados. Al menos 24 horas, o idealmente de 48 a 120 horas, después de la inyección de bevacizumab, se administrará una composición inhibitoria de anti-integrina beta 1 a través de dichos catéteres a través de un dispositivo de administración mejorado por convección (CED) a una dosis y velocidad clínicamente relevantes.

En otra realización, el régimen anterior se combinará con una terapia adyuvante adicional tal como radiación ionizante y/o quimioterapia. En otra opción de uso, el régimen anterior puede administrarse a un GBM recién diagnosticado. En otra realización, tanto la composición antiangiogénica como la composición inhibitoria de anti-integrina beta 1 se administrarán a través de CED. En otra opción, para usar tanto la composición antiangiogénica como la composición inhibitoria de anti-integrina beta 1 se administrarán por vía parenteral. En otra opción, una o ambas composiciones se administrarán directamente al lecho tumoral en un vehículo inerte tal como un polímero biocompatible soluble. En otra opción, ambas composiciones se administrarán simultáneamente como un anticuerpo bivalente. En otra opción, la composición inhibitoria de anti-integrina beta 1 se administrará sola a un paciente que ha fallado la terapia antiangiogénica anterior. En otra realización, la composición inhibitoria de anti-integrina beta 1 se administrará sola a un paciente que no ha recibido terapia antiangiogénica. En otra realización, la composición de anti-integrina beta 1 puede comprender además un radioisótopo unido a la misma, particularmente un elemento emisor beta.

Un agente alternativo para inducir hipoxia, además de la terapia antiangiogénica, es usar técnicas endovasculares para embolización de vasos (embolización superselectiva/embolización dirigida). Este procedimiento es conocido para su uso en lesiones cerebrales altamente vasculares, como los meningiomas y las malformaciones arteriovenosas (AVMs), a fin de reducir la lesión y proporcionar así circunstancias más favorables para la resección quirúrgica.

La inhibición de este objetivo puede ser efectiva contra varios cánceres que expresan integrinas beta 1 más allá de GBM, incluyendo la mayoría de tumores epiteliales y no epiteliales, tales como los de mama, pulmón, hígado, riñón, colon, melanoma y linfoma. Puede haber un uso adicional para una composición anti-beta 1 para inhibir la angiogénesis en enfermedades no neoplásicas tales como la degeneración macular húmeda relacionada con la edad. Finalmente, puede haber uso de una composición anti-beta 1 para indicaciones antiinflamatorias, ya que la señalización de integrina beta 1 es importante para algunas funciones de las células inmunitarias, incluyendo la adhesión y la proliferación.

Un uso alternativo se relaciona con potenciar la vascularización en un sistema biológico como en una estrategia de medicina regenerativa. En una realización de este tipo, la modulación selectiva tanto de la angiogénesis como de la cooptación del vaso adhesivo puede dar como resultado una reparación o regeneración tisular mejorada.

5 También se describe el uso de shRNA (RNA de horquilla corta) para eliminar la expresión del gen de la integrina beta 1 en una célula tumoral. Esto se llevó a cabo en un ejemplo a continuación, donde se mostró una reducción significativa en el crecimiento de células tumorales en una línea celular resistente a un anticuerpo anti-VEGF. En el trabajo ejemplificado, los shRNAs son precursores de los RNA cortos de interferencia (siRNAs) que son los mediadores potentes del RNA de interferencia (RNAi). En RNAi, los genes homólogos en secuencia al siRNA se silencian en el estado post-transcripcional. Existe una variedad de diferentes estructuras en horquilla que pueden dar lugar a siRNAs efectivos. Los lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), son capaces de infectar células que no se dividen, incluyendo neuronas diferenciadas del cerebro. Los RNAs de horquilla corta pueden expresarse a partir de lentivirus, lo que permite la transfección de alta eficacia de una variedad de tipos de células. Se puede diseñar un constructo de horquilla de RNA eficaz en función de la secuencia del gen que se silenciará. La integrina beta 1 es una proteína que, en humanos, está codificada por el gen ITGB1. El mRNA humano completo para la subunidad de integrina beta 1 se expone en el locus X07979 de Genbank y el número de acceso BC020057. Esta secuencia de 3656 nucleótidos (SEQ ID NO: 1), también proporcionada en J. Cell Biol. 105 (3), 1183-1190 (1987) no se reproduce aquí en aras de la brevedad. Esta secuencia conocida puede usarse para diseñar construcciones de ácido nucleico interferentes tales como el shRNA ejemplificado.

20 Aunque no todas las construcciones de horquilla producirán una respuesta eficaz de RNAi, se han desarrollado reglas que enriquecen las construcciones exitosas. Estas reglas se basan en el examen de un gran número de constructos efectivos y análisis termodinámicos de microRNAs y siRNAs efectivos. Las reglas se publican, por ejemplo, en el boletín técnico Ambion # 506, disponible en línea.

25 La preparación de virus competentes a partir de vectores de DNA implica empacar el constructo en una línea celular. Empacar un lentivirus de RNAi es esencialmente lo mismo que empacar un lentivirus que lleva un cDNA. En esencia, los vectores de DNA se transfectan transitoriamente en una línea celular de empaquetamiento, tal como células 293 humanas, y después de 2-3 días, el sobrenadante contendrá el virus.

30 En su mayor parte, los sistemas de producción de vectores lentivirales se basan en un sistema de "división", en el que el genoma vírico natural se ha dividido en construcciones de plásmidos auxiliares individuales. Esta división de los diferentes elementos virales en tres o cuatro vectores separados disminuye el riesgo de crear un virus capaz de replicarse mediante la recombinación adventicia del genoma lentiviral.

35 Al elegir un sistema de producción lentiviral para producir un *knockdown* de integrina beta 1, se pueden preparar virus que tienen un rango de hospedadores restringido (es decir, virus que pueden infectar solo roedores) frente a un amplio rango de hospederos (virus que pueden infectar ratones, aves, humanos, etc.). En su mayor parte, la proteína de la cubierta de superficie viral determina la especificidad de la especie. Debido a que los sistemas de producción lentivirales se dividen, esta proteína de cubierta se puede cambiar utilizando, por ejemplo, la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSV/G) (que muestra un gran tropismo de rango de huésped) frente a una glicoproteína de superficie de unión a maltosa ecotrópica (que muestra una especificidad limitada).

40 Utilizando el explorador de siRNA de Genelink (<http://www.genelink.com/sirna/shrmai.asp>), se identificaron 483 secuencias de shRNA como inhibidores del mRNA de la integrina beta 1 humana, que incluye, por ejemplo, la secuencia

TTCTGGATTGGACTGATCAGTTC (SEQ ID NO.: 2).

45 Los agentes a los que se hace referencia en este documento se administran preferiblemente a un paciente que lo necesita, que padece los tumores descritos aquí, en forma de una composición farmacéutica adecuada para la administración humana. La composición comprenderá el agente, por ejemplo, anticuerpo o ácido nucleico en forma aislada y sustancialmente pura, mezclada con estabilizadores, tampones, excipientes, etc., como se conoce en la técnica, y libre de agentes adventicios.

Los ejemplos a continuación son ilustrativos de ciertos conceptos inventivos que se describen aquí.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Hipoxia asociada a una alta expresión de integrina beta 1

50 Aquí se muestra que la hipoxia, otro estrés celular común en el establecimiento de cánceres de crecimiento rápido y después de la terapia antiangiogénica, se correlaciona con alta expresión de beta 1 en muestras de pacientes con glioblastoma multiforme (GBM). Para confirmar directamente este mecanismo, se sometieron las células de glioma a 6 a 48 h de oxígeno al 1% para simular la hipoxia microambiental.

55 Se observó un aumento significativo en la expresión de integrina beta 1 en células de glioma *in vitro* (**Figura 1**). Esta es una respuesta celular rápida y reversible y también se demostró en células de carcinoma de mama y colorrectal.

Para verificar que la terapia antiangiogénica puede aumentar agudamente la expresión de beta 1 en tumores en crecimiento *in vivo*, se tiñeron tumores de glioma de ratones tomados a los pocos días del último tratamiento con bevacizumab. Se observaron incrementos marcados en beta 1 en los tumores tratados en comparación con los controles, particularmente en el núcleo del tumor hipóxico (**Figura 2**).

5 Ejemplo 2: Expresión incrementada de integrina beta 1 observada durante la proliferación de células tumorales

Se observaron aumentos adicionales en la expresión de beta 1 en células tumorales *in vitro* durante la propia proliferación de células tumorales. Existe una correlación inversa entre la confluencia celular *in vitro* y el nivel de beta 1 en células de glioma U87MG (**Figura 3**). Además, la expresión del marcador de proliferación Ki-67 se correlacionó positivamente con la expresión de beta 1 en células de glioma U87MG, como se demostró mediante FACS. Esto es consistente con lo que otros han observado en células de carcinoma de mama. Finalmente, se observaron visualmente incrementos significativos en la expresión de integrina beta 1 en vasos angiogénicos en muestras quirúrgicas humanas a partir de GBM primario (**Figura 4**). Se cree que esta expresión incrementada de integrina beta 1 está relacionada con la asociación de proliferación beta 1 para la proliferación celular observada en células de glioma, como se discutió anteriormente. Por lo tanto, además de la invasión y el crecimiento en los vasos, la integrina beta 1 parece estar íntimamente involucrada en la proliferación de células tumorales, señalización de supervivencia después de hipoxia e IR, y en células endoteliales vasculares durante el proceso de angiogénesis. Estas características múltiples hacen que la integrina beta 1 sea un objetivo altamente atractivo para inhibir potencialmente el crecimiento de tumores directamente y como terapia conjuntiva con antiangiogénesis para atenuar el desarrollo de resistencia antiangiogénica.

Ejemplo 3: Implicación de integrina beta 1 en la resistencia al anticuerpo anti-VEGF en células tumorales

20 Para probar la hipótesis de que la integrina beta 1 puede estar involucrada en la resistencia a bevacizumab, se utilizó inmunohistoquímica para la integrina beta 1 en muestras de pacientes emparejadas de GBM tomadas antes del tratamiento con bevacizumab y después del desarrollo de resistencia adquirida a bevacizumab. Se observaron aumentos claros en los tejidos de GBM posterior a bevacizumab en comparación con especímenes no tratados en 9 de 12 pares (75%, **Figura 5**).

25 Para verificar directamente el aumento en la expresión de la integrina beta 1 en las células tumorales después de la resistencia adquirida a bevacizumab, se analizaron las líneas celulares derivadas de GBMs primarios (primera cirugía) y de tejido aislado al menos 30 días después del desarrollo de la resistencia a la terapia antiangiogénica. De hecho, la expresión de la integrina beta 1 fue un promedio de 13 veces mayor en las células del último grupo en comparación con el anterior (**Figura 6**).

30 Para verificar que la regulación positiva de la integrina beta 1 observada fuera funcional, se tiñeron secciones tumorales adyacentes para la quinasa de adhesión focal activada (phospho-FAK<sup>tyr397</sup>). La tinción de fosfo-FAK<sup>tyr397</sup> fue significativamente mayor en las muestras de pacientes tomadas después de la resistencia adquirida a bevacizumab en comparación con las muestras tomadas antes de la terapia (**Figura 7**).

35 Por lo tanto, la integrina beta 1 está funcionalmente regulada positivamente en muestras clínicas de pacientes tomadas después del desarrollo de la resistencia adquirida a bevacizumab.

Ejemplo 4: Disminución de la agresividad en líneas celulares resistentes al anticuerpo anti-VEGF después de la inhibición de integrina beta 1

40 El shRNA de integrina beta 1 en partículas lentivirales se adquirió de Santa Cruz Biotechnology, Inc., catálogo # sc-35675. Se proporciona una mezcla de cuatro secuencias de shRNA diferentes. Este material se usó para transformar las líneas celulares SF8106-Ax1 y SF7796-Ax3 (también conocidas como BRG3 y BRG2, respectivamente), derivadas de pacientes que fallaron para bevacizumab.

45 Se crearon líneas estables de integrinas beta 1 y beta 3 inactivadas (*knockdown*) utilizando un vector lentiviral. Se verificó un 70% de inactivación (*knockdown*) de beta 1 en células BRG3 y una correspondiente disminución del 60% en el crecimiento celular después de 1 semana en comparación con las células de control del vector GFP o células con beta 3 inactivada (**Figura 8**). Para estudiar estas células con más detalle, se aislaron los clones inactivados de BRG3 con más del 90% de beta 1 inactivada y se evaluaron las funciones indicativas de una mayor agresividad de células tumorales, incluyendo la adhesión, propagación celular, migración celular y proliferación celular.

Estos clones inactivados se deterioraron significativamente en las cuatro funciones en comparación con las células de control de vector (**Figura 9**).

50 Para verificar los hallazgos anteriores *in vivo*, se implantaron tres de los clones inactivados BRG3 de integrina beta 1 anteriores por vía subcutánea en ratones atímicos y se siguió el crecimiento tumoral durante 15 meses. Las células tumorales de control de vector crecieron normalmente mientras que no se observó crecimiento de ninguno de los clones inactivados durante todo el período de estudio (**Figura 10**). De hecho, 13 de los 15 (87%) tumores inactivados regresionaron completamente. Para verificar que estos hallazgos son directamente el resultado de la inactivación de beta 1, se implantaron líneas policlonales inactivadas de BRG2 y BRG3 subcutáneamente y de forma similar se controló el crecimiento *in vivo*. Estas líneas demostraron un promedio de 70% de inactivación de beta 1. Como se

predijo, estas líneas crecieron más lentamente que las líneas de control vectorial. Sin embargo, en contraste con el 90% de los clones inactivados, después de varias semanas ambas líneas mostraron un crecimiento latente *in vivo*, sugiriendo una relación dosis-respuesta para la proliferación y los niveles de integrina beta 1 (datos no mostrados).

5 Por lo tanto, una inactivación del 90% o más de beta 1 en líneas de glioma resistentes a bevacizumab atenúa los fenotipos agresivos *in vitro* y previene completamente el crecimiento en un modelo de xenoinjerto *in vivo*.

Ejemplo 5: Tratamiento con anticuerpos de anti-integrina beta 1 de una línea celular resistente a anticuerpos anti-VEGF

10 Para verificar los resultados anteriores con un modo clínicamente relevante de inhibición de beta 1, se utilizó el anticuerpo monoclonal inhibitorio AIB2 bien caracterizado de anti-integrina beta 1 de rata en experimentos de inhibición *in vitro*. Se utilizó una IgG de isotipo emparejado como control. Las líneas de glioma resistentes a Bevacizumab demostraron una inhibición de la función similar a la de los *knockdown* de beta 1, incluyendo la disminución de la adhesión (datos no mostrados) y la migración (análisis dinámico de la película, no mostrado) a 10 µg/ml. Los efectos sobre el crecimiento celular se demostraron con tinción inmunofluorescente para apoptosis/muerte celular (anexina V) o proliferación (antígeno Ki-67). Después de la tinción, las células se clasificaron por citometría de flujo/clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Este análisis demostró una disminución significativa en la tinción de Ki-67 en células de GBM tratadas con AIB2, pero no tuvo efecto sobre la inmunorreactividad de anexina V, consistente con un efecto citostático (datos no mostrados).

20 Este tratamiento con AIB2 se repitió con una línea primaria de GBM *in vitro* para ver si el crecimiento celular se vería afectado por el estado proliferativo. Las células en cultivo subconfluente (fase de crecimiento), pero no aquellas en cultivo confluyente (detención del crecimiento), se inhibieron significativamente mediante el tratamiento con AIB2 durante 2 días (**Figura 11**).

25 Finalmente, el tratamiento *in vivo* con AIB2 a dosis de hasta 5 mg/kg dos veces a la semana inhibió significativamente el crecimiento de la línea resistente a bevacizumab BRG3 (datos no mostrados) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo. La técnica de marcado de final de corte de dUTP de desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) reveló un aumento de la apoptosis en los tumores tratados con AIB2 en la línea BRG3 (datos no mostrados).

Por lo tanto, inhibición de integrina beta 1 con anticuerpos bloqueadores de la función, tal como como AIB2, atenúa los fenotipos agresivos *in vitro* de forma similar a la inactivación de beta 1. Además, la administración parenteral de AIB2 es eficaz para inhibir el crecimiento tumoral de xenoinjertos de glioma clásicos y resistentes a bevacizumab *in vivo*.

30 Ejemplo 6: La inhibición de beta 1 invierte la transición epitelial a mesénquima (EMT) y fenotipos de tipo tallo

35 El crecimiento de células tumorales esferoidales en cultivo es un sustituto del fenotipo de tipo tallo y puede promoverse/enriquecerse mediante factores estresantes tales como hipoxia y pH ácido. La inactivación de beta 1, tanto en una línea celular de glioma clásica (U87MG) como en la línea resistente a bevacizumab BRG3, redujo significativamente la formación de esferoides (datos no mostrados). AIB2 también inhibió el crecimiento esferoidal de células de glioma U87MG inducido por 48 horas de hipoxia (datos no mostrados).

Además del deterioro del crecimiento esferoidal, la inhibición de la integrina beta 1 promovió la reversión de EMT como se demostró por un aumento significativo en el área de células tumorales y una disminución del 50% en el receptor mesenquimal c-met (datos no mostrados).

Ejemplo 7: Potenciación de la terapia antiangiogénica con inhibición de integrina beta 1

40 Como un modelo *in vitro* de los efectos de la terapia antiangiogénica, se sometió a células de GBM primarias en fase de crecimiento a hipoxia durante 2 días, seguido de crecimiento continuo en normoxia durante 2 días. La hipoxia se usa como sustituto *in vitro* de la terapia antiangiogénica, como bevacizumab. La adición de anticuerpos AIB2 para el período de recuperación de 2 días dio como resultado una disminución adicional en el crecimiento de células tumorales en comparación con la hipoxia o el tratamiento con AIB2 solo (**Figura 12**). Por lo tanto, la combinación de la inhibición de integrina beta 1 con la antiangiogénesis prevista potenciaría la eficacia terapéutica.

45 Para verificar los resultados *in vitro* anteriores, se trataron los ratones con tumores subcutáneos de glioma U87MG en crecimiento cada dos semanas con IgG de control (10 mg/kg), bevacizumab (10 mg/kg) o una combinación de dosis bajas alternas de bevacizumab (1 mg/kg) y AIB2 (1 mg/kg). Después de varias semanas de tratamiento, la terapia de combinación alternante en dosis bajas resultó ser tan efectiva para la inhibición del crecimiento tumoral como la dosis estándar de bevacizumab a solas (**Figura 13**). Por lo tanto, la inhibición de la integrina beta 1 con AIB2 permitió una disminución de 20 veces en la dosis de bevacizumab.

55 Así, en resumen, se muestra que la inhibición de la integrina beta 1 puede inhibir el crecimiento de tumores al 1) prevenir la cooptación del vaso y la invasión perivascular (o invasión sobre cualquier sustrato de ECM clásica), 2) reducir la viabilidad de las células tumorales después de insultos tales como IR e hipoxia, posiblemente promoviendo la apoptosis, 3) inhibiendo directamente la proliferación de células tumorales, 4) inhibiendo directamente la

5 angiogénesis dirigiéndose a células endoteliales en proliferación y migración y 5) revirtiendo el fenotipo agresivo tipo tallo incluyendo la transición epitelial a mesenquimal (EMT). Es importante destacar que antagonizar el receptor beta 1 a través de inactivación lentiviral o con AIB2 puede atenuar significativamente el crecimiento de xenoinjertos de glioma resistentes a bevacizumab *in vivo*. Además, el tratamiento con AIB2 puede reducir la dosis necesaria de bevacizumab al menos 20 veces en un modelo de xenoinjerto de glioma.

### Conclusión

10 La descripción específica anterior pretende ejemplificar e ilustrar la invención y no debe verse como una limitación del alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Cualquier patente o publicación mencionada en esta memoria descriptiva pretende comunicar detalles de métodos y materiales útiles para llevar a cabo ciertos aspectos de la invención que pueden no establecerse explícitamente, pero que los trabajadores en el campo entenderían. Se hace referencia a dichas patentes o publicaciones, según sea necesario, con el fin de describir y habilitar el método o material al que se hace referencia.

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación de un primer agente que es bevacizumab y un segundo agente que es un anticuerpo que se une específicamente a integrina beta 1 asociada con cualquier subunidad alfa e inhibe la unión de células tumorales a un sustrato extracelular y bloquea la unión de integrina beta 1 para uso en el tratamiento de un cáncer.
- 5 2. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que, en uso, dicha combinación inhibe el crecimiento de células tumorales en mayor medida que el primer agente o el segundo agente por separado.
3. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el anticuerpo específico para integrina beta 1 es un anticuerpo quimérico, monocatenario o humanizado.
- 10 4. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el anticuerpo es AIB2, BIE11 o un anticuerpo humanizado derivado de AIB2 o BIE11.
5. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha célula tumoral es una célula tumoral de tejido neuroepitelial.

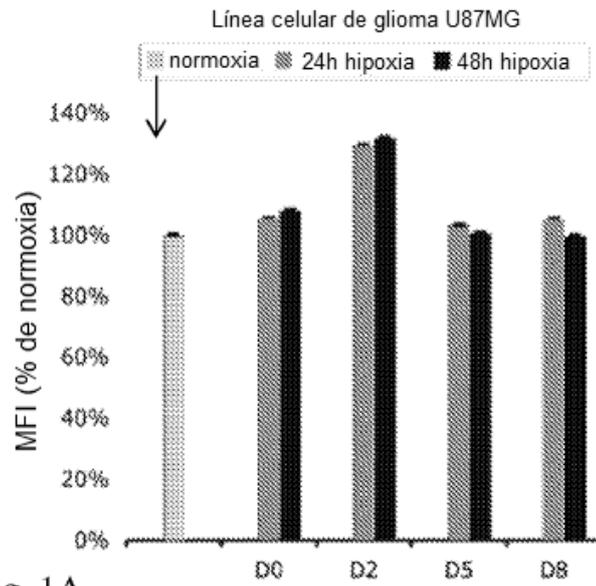


Fig. 1A

carcinoma de mamas MDA-MB-231

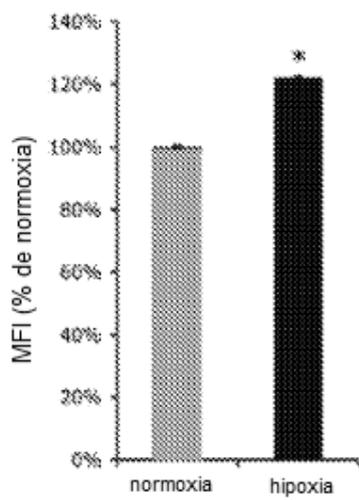


Fig. 1B

carcinoma colorrectal SW1080

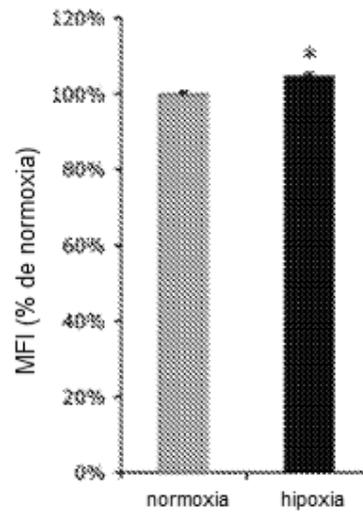
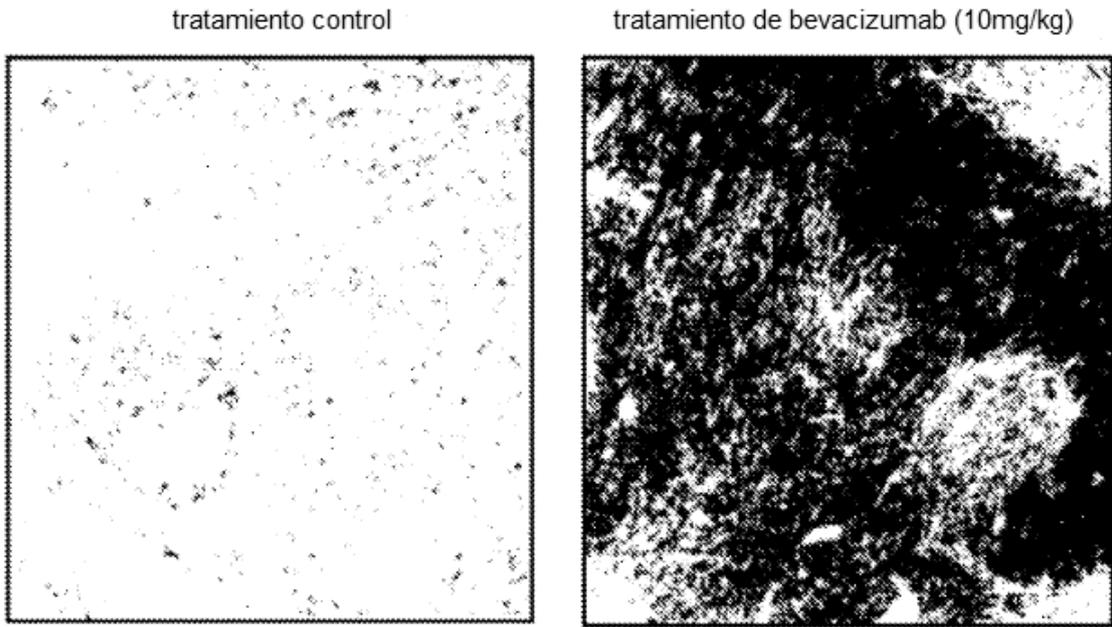


Fig. 1C

Figura 1



(expresión de beta 1 reflejada por tinción negra)

Fig. 2A

Fig. 2B

Figura 2

línea celular de glioma U87MG

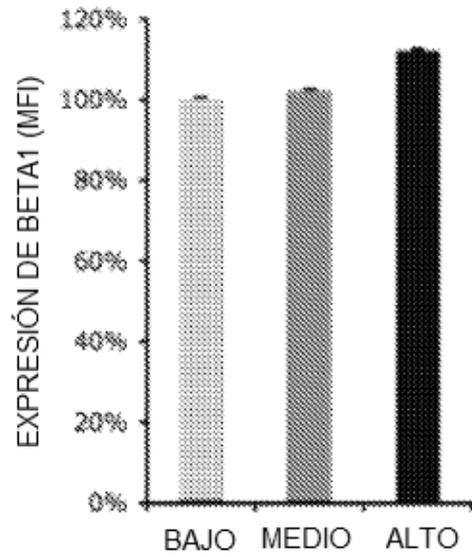


Fig. 3A

(bajo, medio, alto, refleja la proporción de células en la placa que están proliferando activamente)

línea celular de glioma U87MG

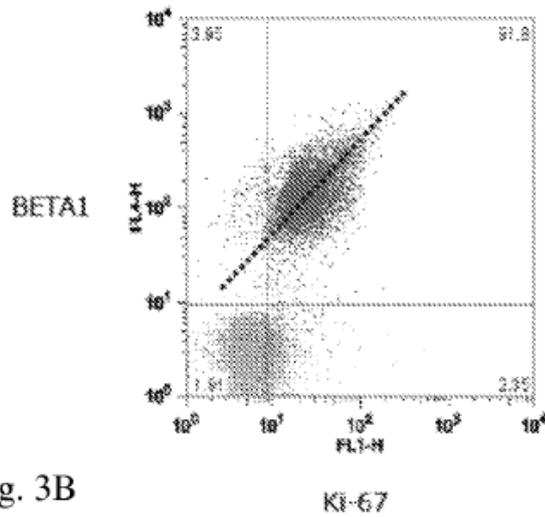


Fig. 3B

Figura 3

área del tumor con vasculatura normal

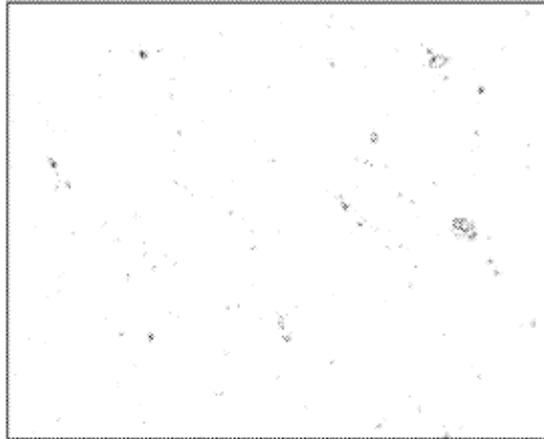


Fig. 4A

área del tumor con vasos glomeruloides angiogénicos

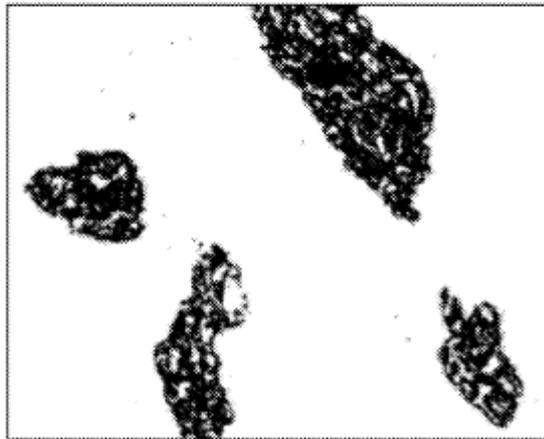


Fig. 4B

(expresión de beta 1 reflejada por tinción negra)

Figura 4

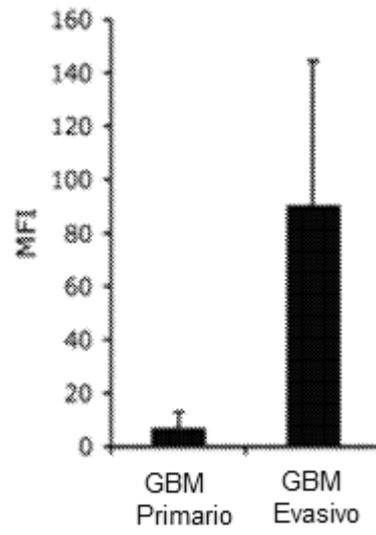


Figura 5

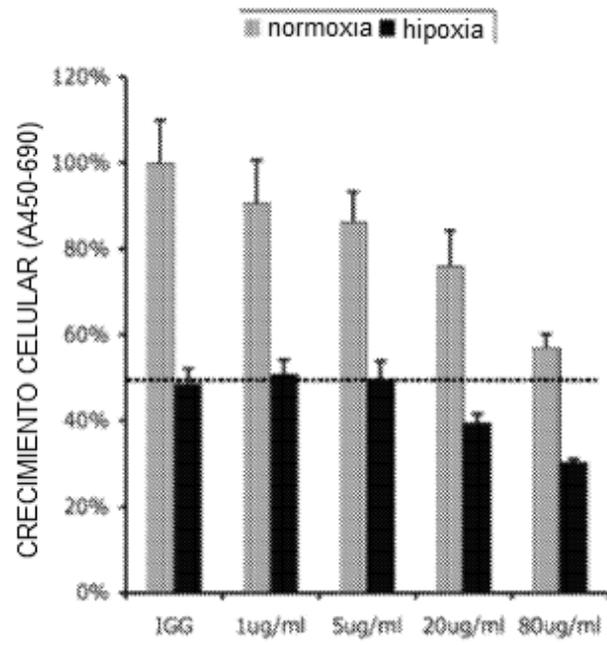


Figura 6

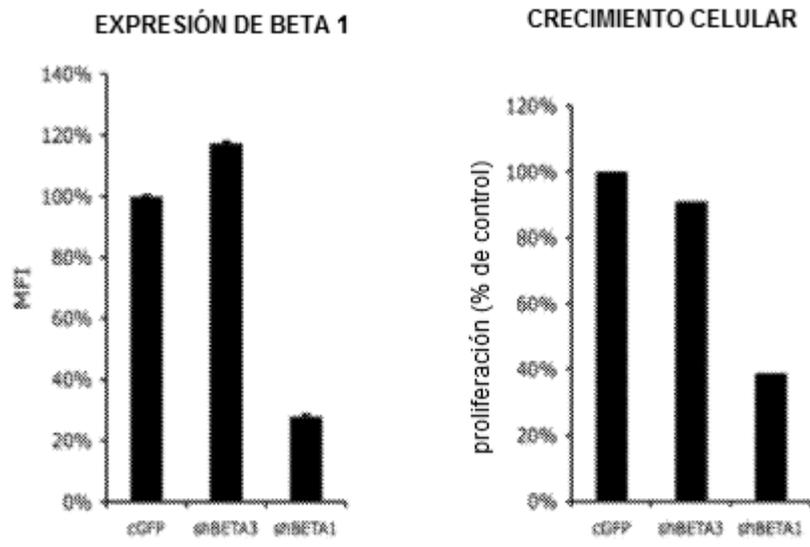


Fig. 7A

Fig. 7B

Figura 7

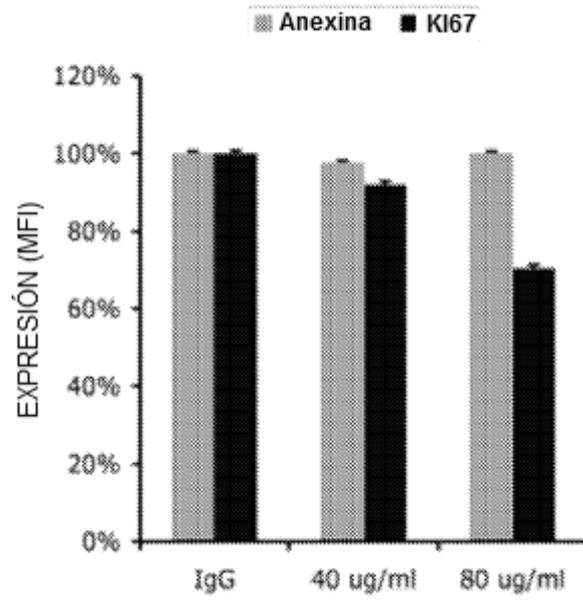


Figura 8

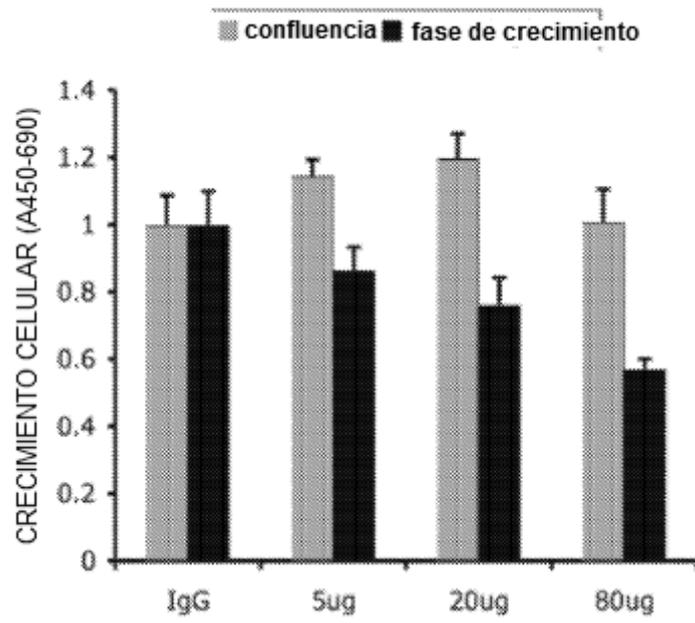


Figura 9

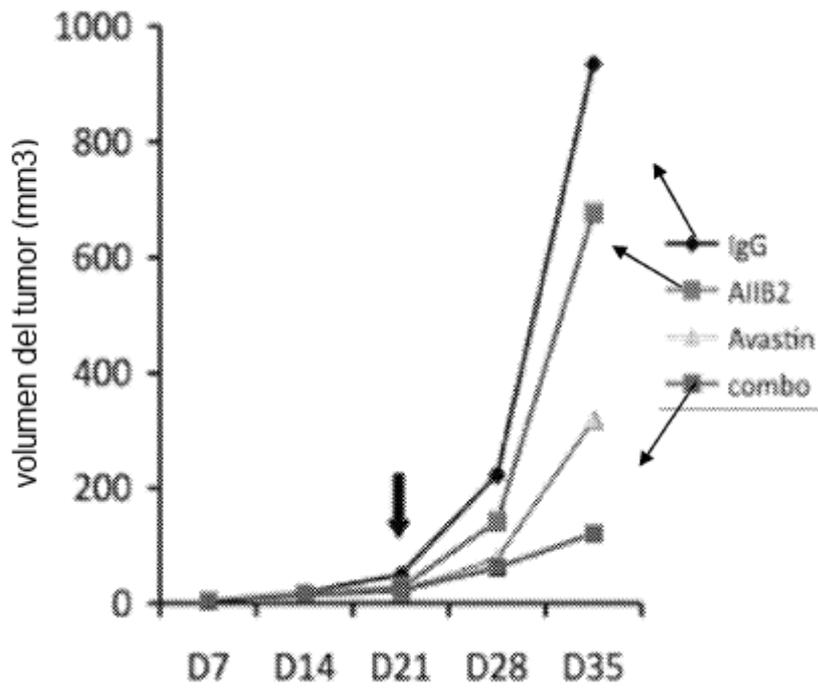


Figura 10

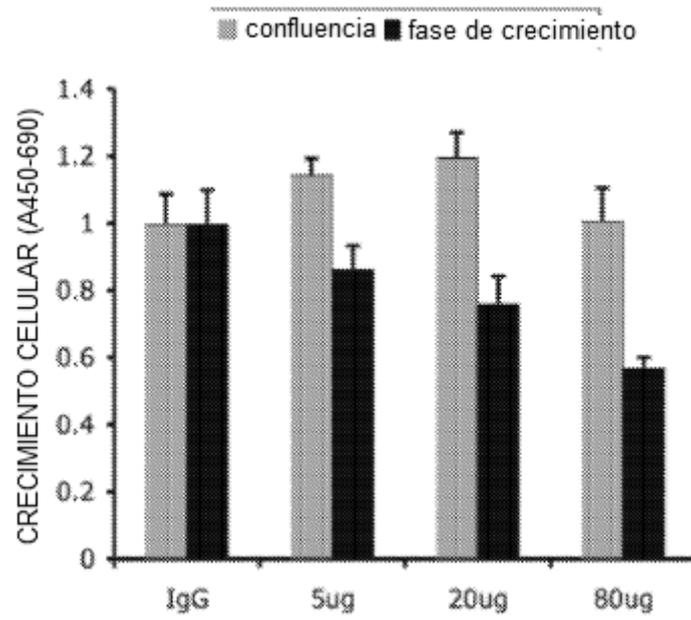


FIGURA 11

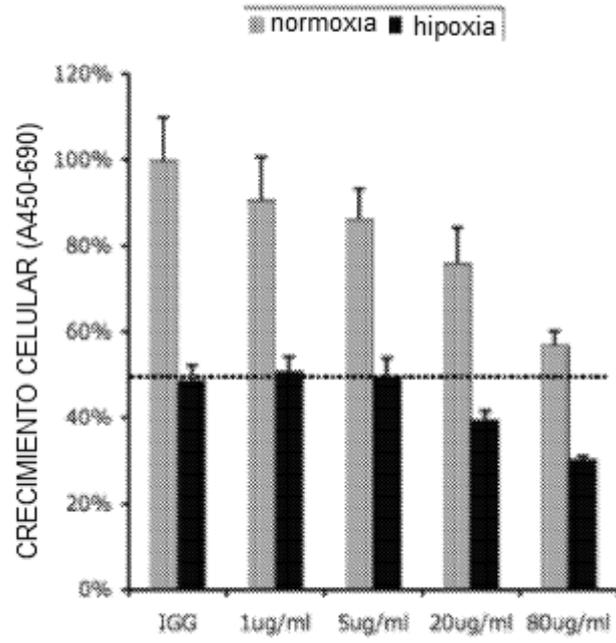


Figura 12

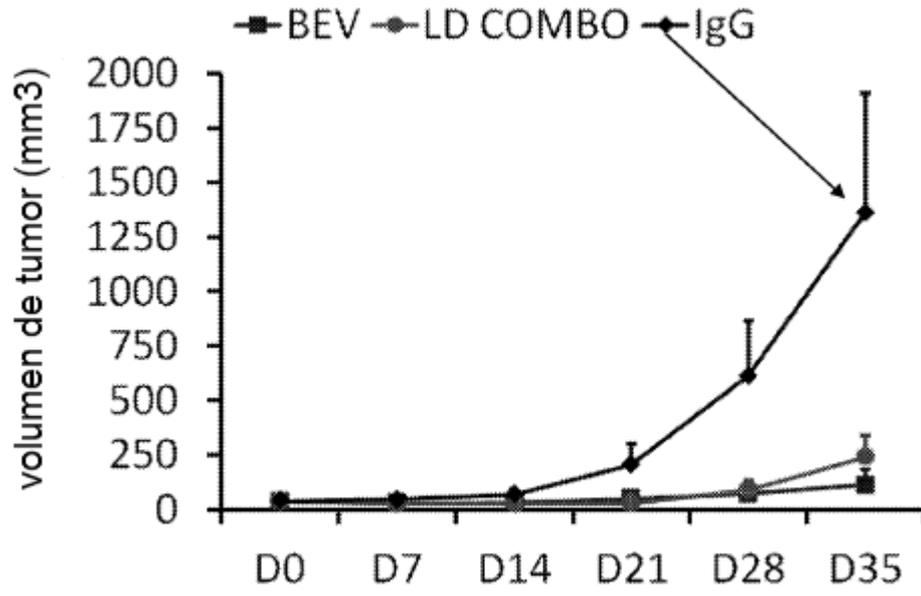


Figura 13