



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 327 088**

② Número de solicitud: 200702309

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 38/04** (2006.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **20.08.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **23.10.2009**

Fecha de la concesión: **08.07.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **26.07.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**26.07.2010**

⑰ Titular/es: **PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.**  
**c/ Etxesakan, 28 - Oficina 5-Planta Baja**  
**31180 Cizur Mayor, Navarra, ES**

⑱ Inventor/es: **Lecanda Cordero, Fernando y**  
**García-Tuñón Llanio, Ignacio**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉑ Título: **Combinaciones terapéuticas para el tratamiento de las metástasis.**

㉓ Resumen:

Combinaciones terapéuticas para el tratamiento de las metástasis.

La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento de la metástasis y, más particularmente, la metástasis ósea originada a partir de un cáncer de pulmón. Las composiciones objeto de la invención comprenden (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1 y (ii) al menos un inhibidor de MMP. La invención también proporciona métodos y kits basados en la composición de la invención para el tratamiento o la prevención de las metástasis, particularmente de las metástasis óseas, para el tratamiento o prevención de la hipercalcemia asociada a la metástasis ósea y para el tratamiento o prevención de la resorción ósea asociada a la metástasis ósea.

ES 2 327 088 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Combinaciones terapéuticas para el tratamiento de las metástasis.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la actividad de TGF $\beta$  y un inhibidor de la actividad de las metaloproteasas de matriz (MMP) y con el uso de dichas composiciones para el tratamiento de metástasis, preferiblemente de metástasis óseas.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La metástasis tumoral es la complicación más devastadora de muchos cánceres, entre ellos del cáncer de pulmón, responsable de aproximadamente un 90% de las muertes. La mediana de supervivencia en pacientes con cáncer pulmonar con metástasis óseas es de aproximadamente 6 meses, el menor de todos los cánceres que presentan metástasis óseas.

20 La metástasis ósea se asocia clínicamente con dolor, compresión medular y fracturas, desencadenando la muerte. El proceso de metástasis posee múltiples etapas e implica una acción coordinada de múltiples genes que permite la invasión e intravasación, supervivencia en los capilares, detención y en ocasiones extravasación y finalmente crecimiento en el órgano diana. La capacidad metastásica de las células tumorales está muy influenciada por su interacción con el microambiente óseo. Las interacciones heterotípicas tumor/estroma, las interacciones célula/matriz, y la estimulación paracrina por factores solubles pueden modular el comportamiento tumoral.

25 A pesar de que los mecanismos de inducción, progresión y metástasis son poco conocidos, se acepta que el microambiente óseo ejerce un fuerte efecto modulando la migración celular, su crecimiento e invasión. El hueso es un importante reservorio de TGF $\beta$ 1, un factor de crecimiento soluble que normalmente es liberado tras la resorción ósea osteoclástica. El TGF $\beta$ 1 está implicado en el desarrollo de metástasis a hueso del cáncer de mama y el bloqueo de su señalización reduce las lesiones osteolíticas de este tumor. Se ha observado que diversos factores presentes en el microambiente óseo como son citoquinas, y factores de crecimiento entre otros, tienen un efecto permisivo para el desarrollo de metástasis. El modelo actual de metástasis ósea de cáncer de mama se basa en la hipótesis de que el TGF $\beta$  liberado durante la lesión osteolítica estimula la producción de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) lo que provoca la secreción por parte de las células del estroma del activador del receptor de ligando NFkappaB (RANKL), lo que a su vez origina la diferenciación de los osteoclastos. El elevado número de osteoclastos provoca un aumento en la resorción ósea resultando en un aumento en la cantidad de TGF $\beta$  liberado del hueso. Esta interacción entre células tumorales y el microambiente óseo resulta en un círculo vicioso de destrucción ósea y crecimiento tumoral.

40 A la vista de este modelo, se han desarrollado distintas terapias antimetastásicas basadas en la inhibición de la señalización del TGF $\beta$ . Así, Muraoka, R. *et al.* (J. Clin. Invest., 2002, 109: 1551-1559) han descrito la capacidad de un inhibidor de TGF $\beta$  formado por un fragmento Fc y la porción extracelular del receptor de TGF $\beta$ 1 para inhibir la aparición de metástasis en pulmón de un carcinoma de mama. Bandyopadhyay, A. *et al.* (Cancer Res., 2006, 66:6714-6721), Ehata, S. (Cancer Sci., 2007, 98:127-133) y Ge, R. *et al.* (Clin. Cancer Res., 2006, 12:4315-4330) han descrito la capacidad de un inhibidor de la quinasa de TGF $\beta$ 1 para inhibir la metástasis pulmonar y esquelética. Por otro lado, Arteaga, C.L. *et al.* (J. Clin. Invest., 1993, 92:2569-2576), Kominsky, S.L. *et al.* (J. Bone Miner. Res., 2007, 22:37-44) han descrito la capacidad de un receptor dominante negativo de TGF $\beta$ 1 de inhibir la metástasis ósea de un carcinoma renal y Hoer, M. y Anderer, F.A. (Cancer Immunol. Immunother. 1995 41:302-8) han descrito la capacidad de anticuerpos anti-TGF $\beta$  para inhibir la metástasis de una línea de carcinoma de mama.

50 En las solicitudes internacionales de patente WO2005/019244 y WO0031135 se describen una serie de péptidos con capacidad de unirse al TGF $\beta$ 1, entre ellos el péptido p17 (SEQ ID NO: 1) y el péptido p144 que posee la capacidad de inhibir la actividad biológica de TGF $\beta$ 1 *in vitro* (restableciendo el crecimiento de la línea celular Mv-1-Lu) e *in vivo* (inhibiendo la inducción de ARNm de colágeno tipo 1 por TGF $\beta$ 1 en un modelo de daño hepático agudo). Sin embargo, en este documento no se indica que p17 o p144 puedan ser de utilidad en el tratamiento de la metástasis.

55 En la solicitud internacional de patente WO2005/059133 se describe una terapia de combinación que comprende un antagonista de TGF $\beta$ 1 (antisense, receptores solubles y similares) y un agente antineoplásico quimioterapéutico. Sin embargo, en este documento no se describe la posibilidad de emplear dicha terapia de combinación para el tratamiento específico de metástasis óseas.

60 La solicitud de patente europea EP1568383 menciona el uso de oligonucleótidos antisentido específicos para la secuencia de distintos mARNs, entre ellos los mARNs que codifican TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3 y MMPs para inhibir la formación de metástasis. Sin embargo, en este documento no se ejemplifica la utilidad de ninguno de estos compuestos, ni de forma aislada ni en combinación, para el tratamiento de metástasis.

65 La capacidad de TGF $\beta$  de promover metástasis parece residir en la capacidad de esta molécula de aumentar la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) en determinadas líneas celulares (Duivenvoorden, W.C. *et al.*, Clin. Exp. Metastasis, 1999, 17:27-34). Así, existen numerosas evidencias que indican que es posible prevenir la

metástasis en distintos tejidos mediante la administración de inhibidores de las MMPs. Por ejemplo, Maekawa, R. *et al.* (Clinical & Experimental Metastasis, 2000, 18:61-66) han descrito la capacidad de un inhibidor de la metaloproteinasas de matriz (MMP) para inhibir la metástasis en hígado y en pulmón de células derivadas de un carcinoma de colon. Oba, K. *et al.* (Cancer Lett., 2002, 175:45-51) han descrito la capacidad del inhibidor de MMP-2 y MMP-9 (MMI-166) de prevenir la metástasis hepática de un tumor de colon. Ohta, M. *et al.* (Jpn. J. Cancer Res., 2001, 92:688-695) han descrito la capacidad de una terapia combinada del inhibidor de MMP-2 y MMP-9 MMI-166 y mitomicina C para prevenir la metástasis hepática del cáncer de colon. Maki, H. *et al.* (Clin. Exp. Metastasis, 2002, 19:519-26) han descrito la capacidad de una terapia combinada del inhibidor de MMP-2 y MMP-9 MMI-166 y del inhibidor de la topoisomerasa CPT-11 para inhibir la metástasis hepática de una línea celular de colon. Berton, A. *et al.* (J. Biol. Chem., 2001, 276:20458-20465) han descrito la capacidad del ácido eláidico (t9-18:1) para inhibir MMP-2 y MMP-9.

Sin embargo, a pesar de la importancia clínica de la metástasis ósea, existen pocos tratamientos disponibles para dicha condición. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de agentes que sean capaces de impedir la metástasis tumoral.

### Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1 y
- (ii) al menos un inhibidor de MMP

en donde si el inhibidor de TGF $\beta$ 1 es un anticuerpo anti-TGF $\beta$ 1, el inhibidor de la MMP no es un derivado del ácido eláidico.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1
- (ii) al menos un inhibidor de MMP y
- (iii) un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la invención y un carrier farmacéuticamente aceptable.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición farmacéutica que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1
- (ii) al menos un inhibidor de MMP y
- (iii) opcionalmente, un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de las metástasis.

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición farmacéutica que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1
- (ii) al menos un inhibidor de MMP y
- (iii) opcionalmente, un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la hipercalcemia asociada a la metástasis ósea.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición farmacéutica que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1 y
- (ii) al menos un inhibidor de MMP y
- (iii) opcionalmente, un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la resorción ósea asociada a la metástasis ósea.

En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende en uno o varios contenedores

- (i) una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1,
- (ii) una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un inhibidor de MMP y
- (iii) opcionalmente, una formulación farmacéuticamente aceptable de un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea.

En un octavo aspecto, la invención se relaciona con el uso de un inhibidor de MMP para potenciar el efecto antimetastásico de un inhibidor de TGF $\beta$ 1.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1A: Actividad proteolítica en sobrenadantes de células de cáncer de pulmón no microcíticas, incubadas solas con medio (vehículo) o en co-cultivos con células estromales ST-2, en donde las células de cáncer de pulmón no han sido transducidas (control), o han sido transducidas con SUSD5/TCF4/PRKD3 (Células met. 1) o con MCAM/TCF4/PRKD3 (Células met. 2). La actividad proteolítica se expresa como incremento relativo de la fluorescencia (% $\Delta$  RFU). Los valores representan la media  $\pm$  SEM (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Figura 1B: Actividad proteolítica en sobrenadantes de células de cáncer de pulmón no microcíticas con tropismo óseo transducidas con SUSD5/TCF4/PRKD3 (Células met. 1) o MCAM/TCF4/PRKD3 (Células met. 2), incubadas en co-cultivo con células ST-2. Se valoró la actividad proteolítica en presencia de aprotinina, GM6001 300  $\mu$ M y GM6001 600  $\mu$ M. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Figura 2A: Esquema experimental del modelo de metástasis ósea con indicación de los tiempos de administración de los agentes a ensayar.

Figura 2B: Curvas Kaplan-Meier de supervivencia de ratones nu/nu inoculados por vía intracardiaca con células de cáncer de pulmón altamente metastásicas con tropismo a hueso en animales tratados con vehículo solamente (control), tratados con p144, tratados con GM6001 y tratados con una combinación de p144 y GM6001.

Figura 2C: *Panel superior*: Perfiles de metástasis ósea en ratones nu/nu inoculados por vía intracardiaca con células de cáncer de pulmón altamente metastásicas con tropismo a hueso y transfectadas con luciferasa en los días 8, 15 y 19 tras la inoculación de las células y tratados con vehículo (control), p144, GM6001 y una combinación de p144 y GM6001. *Panel inferior*: Representación gráfica de la luminiscencia emitida por los animales analizados en el panel izquierdo, representada como emisión normalizada de fotones.

Figura 2D: Representación del área de metástasis frente al total de superficie ósea (%) en ratones nu/nu inoculados por vía intracardiaca con células de cáncer de pulmón altamente metastásicas con tropismo a hueso tratados con vehículo (control), p144, GM6001 y la combinación de GM6001 y p144. Los valores representan la media  $\pm$  SEM (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, calculado mediante *rank sum* test con ajuste de Bonferroni).

Figura 2E: Imágenes representativas tomadas de la extremidad inferior en ratones nu/nu inoculados por vía intracardiaca con células de cáncer de pulmón altamente metastásicas con tropismo a hueso sometidos a tratamientos con vehículo (control), p144, GM6001 y la combinación de GM6001 y p144. *Panel superior*: imágenes de rayos X; *Panel intermedio*: reconstrucción tridimensional mediante tomografía computerizada ( $\mu$ CT scanning); *Panel inferior*: imágenes de secciones teñidas con hematoxilina-eosina, donde los asteriscos indican la presencia de tumores.

#### Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que el uso combinado de un inhibidor de TGF $\beta$ 1 y de un inhibidor de MMP tiene un efecto sinérgico en la reducción de la metástasis ósea y de la carga tumoral en el hueso en relación al resultado observado cuando los distintos agentes se usan por separado.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1 y
- (ii) al menos un inhibidor de MMP

en donde si el inhibidor de TGF $\beta$ 1 es un anticuerpo anti-TGF $\beta$ 1, el inhibidor de la MMP no es un derivado del ácido eláidico.

Por “inhibidor de TGF $\beta$ 1” se entiende en el contexto de la presente invención, cualquier compuesto capaz de impedir la transmisión de la señal causada por la interacción de TGF $\beta$ 1 con su receptor. Inhibidores de TGF $\beta$ 1 que pueden ser utilizados en el contexto de la presente invención incluyen compuestos que impiden de forma competitiva o alostérica la unión de TGF $\beta$ 1 a su receptor, compuestos que secuestran o unen TGF $\beta$ 1 y compuestos capaces de inhibir la señalización intracelular de TGF $\beta$ 1. Preferiblemente, la invención contempla el uso de inhibidores que actúan impidiendo la unión de TGF $\beta$ 1 a su receptor tales como proteínas solubles que se unen y secuestran TGF $\beta$ 1 de forma natural (LAP, decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano, endogлина, macroglobulina alpha2), receptores que compiten con el receptor endógeno de TGF $\beta$ 1 por la unión al ligando, como por ejemplo, BAMBI, o receptores que potencian la unión de TGF $\beta$ 1 a su receptor de tipo II, como por ejemplo el betaglicano. Entre los inhibidores de TGF $\beta$  que impiden la unión de TGF $\beta$  a sus receptores se encuentra los anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para el TGF $\beta$ , anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para el receptor de TGF $\beta$  y formas solubles del receptor de TGF $\beta$ . En una forma de realización preferida, el inhibidor de TGF $\beta$  es un péptido sintético seleccionado por su capacidad de unirse a TGF $\beta$ 1 y de inhibir su actividad. Ejemplos de dichos péptidos sintéticos son los descritos en las solicitudes internacionales de patente WO0031155, WO200519244 y WO0393293, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente invención. En una forma particular de realización, el inhibidor de TGF $\beta$  es un péptido seleccionado del grupo del péptido p17 (SEQ ID NO:1), los péptidos p17(1-11) (SEQ ID NO:2), p17(1-12) (SEQ ID NO:3), p17(1-13) (SEQ ID NO:4) y p17(1-14) (SEQ ID NO:5) que corresponden a variantes de p17 truncadas en su extremo C-terminal de, respectivamente, 11, 12, 13 y 14 amino ácidos, así como las variantes de los péptidos p17(1-11), p17(1-12), p17(1-13) y p17(1-14) resultantes de su amidación y/o acetilación. En otra forma preferida de realización, el inhibidor de TGF $\beta$  es el péptido p144 (SEQ ID NO:6). En otra forma preferida de realización, el inhibidor de TGF $\beta$  es una variante funcionalmente equivalente de los péptidos definidos por las secuencias SEQ ID NO:1 a 6. Por variante funcionalmente equivalente de los péptidos p17 y p144 se entiende cualquier péptido cuya secuencia se pueda obtener mediante inserción, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de las secuencias de SEQ ID NO:1 y 2 y que conserve al menos parcialmente la capacidad de inhibir TGF $\beta$ 1. Ensayos adecuados para determinar la capacidad de un determinado compuesto de inhibir la actividad TGF $\beta$ 1 incluyen el ensayo de inhibición de crecimiento de la línea celular MV-1-Lu así como el ensayo de inhibición de la fibrosis hepática en modelos animales de cirrosis inducida por CCl<sub>4</sub> según se describen en WO0031155 y WO200519244.

Por “inhibidor de MMP” se entiende en el contexto de la presente invención, un compuesto capaz de bloquear sustancialmente la actividad proteolítica de al menos una isoforma de MMP con una concentración inhibidora 50 (IC50) de al menos 100 nM, al menos 50 nM, al menos 10 nM, al menos 9 nM, al menos 8 nM, al menos 7 nM, al menos 6 nM, al menos 5 nM, al menos 4 nM, al menos 3 nM, al menos 2 nM, al menos 1 nM, al menos 0,9 nM, al menos 0,8 nM, al menos 0,7 nM, al menos 0,6 nM, al menos 0,5 nM, al menos 0,4 nM, al menos 0,3 nM, al menos 0,2 nM o al menos 0,1 nM de al menos una MMP seleccionada del grupo de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-24, MMP-25, MMP-26, MMP-27, MMP-28, MMP-29 y MMP-30. La invención contempla el uso tanto de inhibidores de MMPs de amplio espectro capaces de bloquear la actividad de un número sustancial de isoformas de MMP como inhibidores específico para un número reducido de isoformas de MMP. En este último caso, la MMP bloqueada es preferiblemente MMP-2 o MMP-9. Inhibidores útiles en el contexto de la presente invención incluyen compuestos sintéticos tales como ilomastat (hidroxamidocarbonilmetil-4-metilpentanoil-L-triptófano metilamida), marimastat, tetraciclinas, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocade, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la metaloproteinasa (TIMP) 1, 2, 3 y 4, los inhibidores peptídicos descritos en WO2005103071, los derivados de la triazolona descritos en WO2005095362, los derivados del ácido hidroxámico descritos en WO2005077937 y WO2005042521, las baril sulfonamidas descritas en WO2005061477, los compuestos descritos en WO2005026120 y WO2005016868, los derivados de trioxopirimidina descritos en US6110924, los compuestos amídicos o peptidilamídicos que contienen grupos tiol descritos, por ejemplo, en WO95/12389. Ensayos adecuados para determinar la capacidad de compuestos de inhibir la actividad MMP incluyen, por ejemplo, los ensayos de procesamiento del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR) mediado por MMP-9 según se describe en WO2005103071, así como ensayos comerciales que permiten la identificación en paralelo de inhibidores de varias MMPs, tales como el “MMP Profiling Kit” de BIOMOL, basado en la detección de la inhibición del procesamiento del péptido fluorogénico OmniMMP (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>, en donde Mca corresponde a 7-metoxicumarin-4-il)-acetil y Dpa corresponde a N-3-(2,4-dinitrofenil)-L-a- $\beta$ -diaminopropionil) o el kit de detección de R&D systems, basado en la fluorescencia resultante de la degradación de un péptido fluorogénico sintético (Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys-(Dnp)-NH<sub>2</sub>).

La invención también contempla terapias combinadas en las que se utilizan simultaneo secuencialmente las composiciones de la invención junto con otros agentes que son capaces de prevenir o de inhibir la metástasis ósea o con agentes quimioterapéuticos convencionales.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1
- (ii) al menos un inhibidor de MMP y
- (iii) un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea.

Agentes quimioterapéuticos que pueden ser usados en el contexto de la presente invención en combinación con las composiciones de la invención incluyen agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, agentes antitubulina, sensibilizadores de quimioterapia, agentes que se unen al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluorinadas, lexitropinas, toxinas de plantas y microbios, nitrosoureas, platinos, antimetabolitos de purina, puromicinas, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa; alcaloides de la vinca y similares.

Ejemplos de compuestos inhibidores de la metástasis ósea son los bifosfonatos, como por ejemplo el alendronato, zoledronato, clodronato, palmidronato o etridronato, tiludronato, ibandronato o risedronato, tal y como se ha descrito en WO2002/087555, inhibidor del activador del receptor del ligando de NF- $\kappa$ B (RANKL), tal y como ha sido descrito por Michigami, T. *et al.* (Cancer Res., 2001, 61:1637-1644), inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), según se describe en WO1999007412, fosfato de estramustina, tal y como se describe en WO2002007719, eptilonas según se describe en WO2006032537, el inhibidor de la actividad tirosínquinasa de bcr-abl dasatinib, según se describe en WO2007047893, antagonistas de M-CSF según se describe en WO200781879, PSP-94, según se describe en WO0339576. En una forma de realización preferida, el agente para el tratamiento de la metástasis ósea es un bifosfonato o un derivado del mismo o un inhibidor de RANKL.

En una forma de realización preferida, el inhibidor de TGF $\beta$  se selecciona del grupo de el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4), el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5) y el péptido p144 (SEQ ID NO:6) o una variante funcionalmente equivalente de los mismos. En otra forma de realización preferida, el inhibidor de MMP es ilomastat. En una forma de realización aun más preferida, la composición comprende el péptido p17 e ilomastat.

La combinación de acuerdo a la presente invención puede incorporarse en una composición farmacéutica para su uso en medicina. Así, en otra forma de realización, la invención se relaciona con una preparación que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de la invención y un carrier farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la invención se relaciona con una composición de acuerdo a la invención para su uso en medicina.

Para uso en medicina, las combinaciones de compuestos de la invención pueden encontrarse en forma de prodroga, sal, solvato o clatrato, bien de forma aislada o bien en combinación con agentes activos adicionales. Las combinaciones de compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser formuladas conjuntamente con un excipiente que sea aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20<sup>a</sup> edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000). El experto en la materia advertirá que la dosis adecuada y la cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor deberá ser optimizada para cada caso particular dependiendo de factores tales como la edad, el peso y la condición médica del individuo, la severidad de la enfermedad, la ruta y frecuencia de la administración, el compuesto particular empleado, la localización de la metástasis así como las propiedades farmacocinéticas del individuo. Las composiciones farmacéuticas objeto de la invención pueden contener una cantidad de los principios activos que oscila entre 0,1 y 2000 mg, preferiblemente en el rango de 0,5 a 500 mg y aún más preferiblemente entre 1 y 200 mg. Dosis apropiadas de las composiciones pueden oscilar entre 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal, con el fin de alcanzar niveles plasmáticos de los principios activos del orden de 100 a 5000 nM, tales como 300 a 2000 nM. Las composiciones se pueden administrar un número variable de veces al día, particularmente de 1 a 4 dosis al día.

Las composiciones de acuerdo a la invención han demostrado ser capaces de impedir y prevenir la aparición de metástasis óseas originadas a partir tumores pulmonares. Por metástasis se entiende, en el contexto de la presente invención, el proceso por el cual células cancerosas se propagan a otros órganos distintos a donde se originó el tumor primario por medio de canales linfáticos y vasos sanguíneos. El experto en la materia advertirá que las composiciones

de la presente invención resultan de utilidad no sólo para el tratamiento o prevención de la metástasis ósea originada a partir de tumores de pulmón, sino que pueden tener una aplicabilidad más general para la inhibición de cualquier tipo de metástasis formada a partir de prácticamente cualquier tipo de tumor. Así, en otra forma de realización, la invención se relaciona con el uso de una composición de la invención o de una preparación farmacéutica de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis.

La invención contempla el uso de las composiciones de la invención para el tratamiento de las metástasis en cualquier órgano del cuerpo, tales como cabeza y cuello (cara, ojo, boca, lengua, dientes, nariz, orejas, cuero cabelludo, laringe, faringe, glándulas salivares, meninges, cerebro, glándula tiroidea y paratiroidea), espalda y columna vertebral (vértebras y médula espinal), tórax (glándulas mamarias, costillas, pulmones, corazón, mediastino, esófago y diafragma), abdomen (peritoneo, estómago, duodeno, intestino, colon, hígado, riñón, glándula suprarrenal, apéndice y páncreas), pelvis (sacro, cóccix, ovarios, trompa de Falopio, útero, vagina, vulva, clítoris, perineo, vejiga urinaria, testículos, recto y pene) y extremidades (músculo, hueso, nervios, mano, muñeca, codo, hombro, cadera, rodilla o tobillo).

Por otro lado, los tumores a partir de los que se origina la metástasis incluyen, sin ser limitante, tumores de pulmón, de próstata, de cabeza y cuello, de testículo, de cerebro, de piel, de colon, de recto, de esófago, de traquea, de páncreas, de hígado, de mama, de ovario, de sistema linfático, leucemia, cervical, melanoma, de riñón, de vejiga, de tiroides, de hueso y de estómago. En una forma de realización preferida, el tumor que origina la metástasis es un tumor que muestra una alta propensión a metastatizar en tejido óseo, tales como carcinomas y, más particularmente, tumores de pulmón, mama, próstata, tiroides y riñón.

En una forma preferida de realización, la metástasis que se trata usando las composiciones de la invención son metástasis óseas. En una forma más preferida, la metástasis se origina a partir de un cáncer de pulmón. En una forma de realización aún más preferida, el cáncer de pulmón que origina la metástasis es un cáncer no microcítico. En una forma de realización aún más preferida el cáncer de pulmón no microcítico se selecciona del grupo de carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

Asimismo, las combinaciones objeto de la presente invención resultan de utilidad para el tratamiento y prevención de otras condiciones asociadas con la metastasis ósea tales como la hipercalcemia y la resorción ósea. Así, en otra forma de realización, la invención se relaciona con el uso de una composición según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hipercalcemia asociada a la metástasis ósea. En otra forma de realización, la invención se relaciona con el uso de una composición según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la resorción ósea asociada a la metástasis ósea. Las composiciones de la invención, cuando se utilizan para el tratamiento o prevención de la hipercalcemia o de la resorción ósea se usan preferentemente cuando la metástasis ósea que origina dichos síntomas es una metástasis ósea originada a partir de un cáncer de pulmón. Preferiblemente, el cáncer de pulmón del que se originan las metástasis es un cáncer no microcítico.

Las composiciones farmacéuticas objeto de la presente invención pueden encontrarse en forma de kit. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende en uno o varios contenedores

- (i) una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1
- (ii) una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un inhibidor de MMP y
- (iii) opcionalmente, una formulación farmacéuticamente aceptable de un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea.

Por "kit" se entiende, en el contexto de la presente invención, un producto que contiene los distintos principios activos que forman la composición empaquetados para permitir su transporte, almacenamiento y administración de forma simultánea o secuencial. Así, los kits de la invención pueden contener una o más soluciones oftálmicas, suspensiones, comprimidos, capsulas, inhaladores, jeringuillas, parches y similares que contienen los principios activos de acuerdo a la invención y que se pueden encontrar preparadas en forma de una dosis única o como múltiples dosis. Adicionalmente, el kit puede contener el vehículo adecuado para la resuspensión de las composiciones de la invención tales como medios acuosos tales como solución salina, solución Ringer, solución Ringer lactato, dextrosa, dextrosa y cloruro sódico, medios solubles en agua tales como alcohol, polietilenglicol, polipropilenglicol y vehículos insolubles en agua tales como aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato bencílico. Otro componente que puede estar presente en el kit es un empaquetamiento que permite mantener las formulaciones de la invención dentro de unos límites determinados. Materiales adecuados para la preparación de tales empaquetamientos incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. Adicionalmente, los kits de la invención pueden contener instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionen dichas instrucciones.

## ES 2 327 088 B1

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un inhibidor de MMP para potenciar el efecto antimetastático de un inhibidor de TGF $\beta$ -1.

5 En una forma de realización preferida, el inhibidor de TGF $\beta$  se selecciona del grupo de el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4), el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5) y el péptido p144 (SEQ ID NO:6) o una variante funcionalmente equivalente de los mismos.

10 La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que tienen un carácter ilustrativo y en ningún caso limitativo.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

15 *Modelo experimental de interacción estroma-tumor*

20 Se realizaron ensayos *in vitro* mediante cocultivo de células tumorales y células estromales, con el objetivo de mimetizar y reproducir las interacciones estroma-tumor que tienen lugar *in vivo*.

25 Por una parte se utilizaron células NCI-H460 (ATCC, HTB-177). Estas células fueron aisladas originalmente a partir de una efusión pleural de un varón diagnosticado de carcinoma de células grandes aisladas originalmente por Banks-Schlegel, S. P. *et al.* (Cancer Res., 1985, 45:1187-1197). Estas células H460 conservan intacta la proteína p53 y presentan una mutación homocigótica en el codon 183 de K-Ras.

30 Por otra parte, se utilizaron células estromales ST2 (Riken Cell Bank, Tsukuba, Japan) que se cultivaron en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino. El resto de las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino.

35 Para los ensayos se sembraron células H460 ( $1 \times 10^6$ ) en placas de cultivo de 10 cm, solas o en co-cultivo con células ST2 ( $5 \times 10^5$ ), durante 6 días. En algunos ensayos, el cultivo se realizó utilizando células H460 que habían sido transducidas usando el vector retroviral pBabe-Neo con la combinación de los genes SUSD5, TCF4 y PRKD3 o alternativamente con el triplete génico MCAMITCF4/PRKD3. En investigaciones anteriores, los investigadores han podido comprobar que la sobreexpresión concomitante de estos genes en células H460 promueve una mayor actividad metastásica, con un marcado tropismo a hueso. Las células se transdujeron con vectores retrovirales tal como ha sido descrito anteriormente (González *et al.* J. Mol. Med., publicado online el 24 de abril de 2007). Después de 48 horas de incubación se recogió el medio o sobrenadante en el que habían crecido las células y se utilizó para diversos ensayos: tratamiento de células H460, ensayos de actividad de metaloproteasas, etc. Al final del periodo de incubación se realizó también extracción de RNA mediante el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) para análisis de expresión.

40

#### Ejemplo 2

45 *Modelo experimental in vivo de metástasis ósea de cáncer de pulmón no microcítico*

50 Se cultivaron células altamente metastásicas con tropismo a hueso (Número de acceso ECACC 06091547) (derivadas de células NCI-H460 en RPMI al 10% FBS (suero bovino fetal). Se trata de una subpoblación de células derivadas de un carcinoma de células grandes de pulmón no microcítico humano, originalmente aislado a partir de un ganglio linfático de un varón de raza negra y 54 años de edad diagnosticado de un tumor en fase 3. Estas células, con marcado tropismo a hueso, se caracterizan también porque están transfectadas de forma estable con el gen reportero de la luciferasa (Plásmido Triple modality SFG-NES-TGL, donado por V. Ponomarev, MSKC, New York, USA) para poder monitorizar el tropismo mediante la obtención de imágenes por bioluminiscencia *in vivo*.

55 Para su inyección por vía intracardiaca, las células fueron sembradas el día anterior a la inyección a una confluencia del 50%. Las células fueron lavadas en PBS, y resuspendidas a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml en PBS estéril. Para su inyección la viabilidad celular fue siempre  $\geq 95\%$ . La inyección intracardiaca se realizó sobre ratones nu/nu (Harlan, Barcelona, España). Los ratones fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg de masa corporal) y xilazina (10 mg/kg) antes de la inyección intracardiaca de las células. Se inyectaron 200.000 células en 100  $\mu$ l de esta solución en el ventrículo izquierdo del corazón de ratones hembra de 4 semanas de edad mediante una aguja de calibre 29G. 60 Aquellos animales que mostraban un tumor en el compartimento torácico tras el sacrificio fueron eliminados del experimento. Este problema técnico ocurrió en menos de un 0,5% de los animales inyectados.

Tras la inyección de las células, se monitorizó la bioluminiscencia *in vivo* de forma periódica (cada dos semanas) mediante la inyección de D-luciferina (3 mg/100  $\mu$ l, Xenogen Inc.). Igualmente, se obtuvieron radiografías de contacto en animales en posición *decúbito prono* para monitorizar las lesiones óseas empleando un aparato Faxitron (Modelo MS-20) con una película MNR-2000 de alta sensibilidad (Kodak), empleando una exposición de 20 segundos a 20 kV, y x2 aumentos. Las películas fueron reveladas empleando un sistema de procesamiento automatizado (Kodak).

65

El análisis de la región radioluminiscente fue cuantificada mediante software AnalySIS® (Soft Imaging System GmbH, M inster, Alemania). Se obtuvieron imágenes de x 2 aumentos a 1200 ppi mediante un escáner Epson Expression 1680 Pro (Long Beach, CA, USA). La cuantificación del área metastásica se realizó tras la calibración empleando el software de análisis de imágenes. Las radiografías fueron evaluadas sin conocer el grupo de tratamiento al que correspondían.

Para el análisis histológico se extirparon las extremidades posteriores, se retiraron los tejidos blandos del fémur, y se fijaron los huesos durante 24 h en formalina tamponada neutra al 10%. A continuación se deshidrataron y descalcificaron los huesos en una solución que contenía EDTA al 14%. Después de una deshidratación completa, los huesos fueron incluidos en parafina, para posteriormente obtener secciones de 5  $\mu\text{m}$ . Algunas de las secciones se tiñeron con hematoxilina/eosina.

### Ejemplo 3

#### *Actividad proteolítica en co-cultivos de células de cáncer de pulmón altamente metastásicas*

Al efecto de evaluar el papel que la actividad proteolítica de las metaloproteasas juega en la osteolisis producidas por la metastásis óseas del cáncer de pulmón, se valoró la actividad proteolítica en los sobrenadantes de los co-cultivos de células H460 y células ST2 anteriormente descritos.

Para valorar la actividad proteolítica en los sobrenadantes de los cultivos control y co-cultivos se utilizó un ensayo de fluorescencia basado en la degradación de un péptido fluorogénico sintético (Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys-(Dnp)-NH<sub>2</sub>) (R&D systems, Minneapolis, Minnesota). Este péptido es un sustrato adecuado para MMP3, MMP 10 y otras metaloproteasas. Los sobrenadantes de los cultivos, así como los medios de control utilizados, se incubaron a 37°C durante 1 h en presencia del péptido fluorogénico a una concentración final de 20  $\mu\text{M}$ . Opcionalmente, algunas series de experimentos se realizaron en presencia de otras sustancias inhibitorias de la actividad proteasa a ensayar, como por ejemplo: aprotinina (Sigma), un inhibidor de serina-proteasas; GM6001 (Ryss Labs, CA, USA), GM6001, un inhibidor de la actividad de metaloproteasas de amplio espectro; o p17, un péptido inhibidor de la actividad TGF $\beta$ 1 (SEQ ID NO: 1). La aprotinina se utilizó a una concentración final de 1 UI/ $\mu\text{L}$ . El GM6001 se utilizó a una concentración de 300 y 600  $\mu\text{M}$ .

La medida de la fluorescencia se realizó en un espectrofotómetro de fluorescencia (excitación 320 nm, emisión 405 nm, Spectra MAX GeminiXS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La actividad de las metaloproteasas se calculó determinando la pendiente de la curva de fluorescencia en la zona lineal en varios experimentos independientes.

Se observó que los sobrenadantes de co-cultivos de células ST2 con células H460 que sobreexpresan cualquiera de las combinaciones SUSD5/TCF4/PRKD3 (Células met. 1) o MCAM/TCF4/PRKD3 (Células met. 2) presentan una mayor actividad proteolítica que los co-cultivos control con células H460 no transducidas (Fig. 1A), con un aumento 1 aproximado de actividad del 40% ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, cuando los sobrenadantes de los co-cultivos con células H460 transducidas se trataron con aprotinina se observó una inhibición de aproximadamente el 20% de la actividad proteolítica. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor GM6001 inhibió casi completamente la actividad proteolítica, de manera dependiente de dosis (Fig. 1B). Sin embargo, el tratamiento con el péptido p17 inhibidor de la actividad TGF $\beta$ 1 no afectó a la actividad proteolítica, que fue semejante a la observada en los controles no tratados con el péptido.

En conjunto, estos resultados indican que la degradación ósea que se produce *in vivo* puede estar mediada en parte por mecanismos que implican a metaloproteasas liberadas al medio como consecuencia de las interacciones que se producen entre las células metastásicas y las células del estroma.

### Ejemplo 4

#### *Efecto de un péptido inhibidor de la actividad del TGF $\beta$ 1 y de un inhibidor global de la actividad de metaloproteasas sobre la metástasis ósea en el cáncer de pulmón no microcítico*

Se comprobó si la inhibición de la señalización mediada por TGF $\beta$ 1 junto con la inhibición de la actividad de las metaloproteasas podía disminuir la actividad metastásica en el modelo de metástasis ósea en el cáncer de pulmón no microcítico anteriormente descrito.

En este experimento, 28 ratones nu/nu fueron inoculados por vía intracardiaca (i.c.) con células H460 (ECACC Accession Number 06091547) y posteriormente separados aleatoriamente en cuatro grupos de ratones ( $n=7$ ). Como péptido inhibidor de la actividad TGF $\beta$ 1 se utilizó el p144 (SEQ. ID. NO: 6) a una dosis de 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en 200  $\mu\text{L}$  de suero fisiológico. Como inhibidor de la actividad MMP se empleó GM6001 (Ilomastat) a una dosis de 200 mg/Kg en 200  $\mu\text{L}$  de suero fisiológico. Los ratones de cada grupo recibieron uno de los siguientes tratamientos (sustancia a ensayar): 1.- vehículo; 2.- p144; 3.- GM6001; o bien 4.- un tratamiento combinado con p144 y GM6001. El régimen terapéutico consistió en la administración diaria por vía intraperitoneal de la sustancia a ensayar, a partir del día 5

hasta el sacrificio en el día 21, siendo el día 0 el día en el que se realiza la inoculación de las células H460 por vía intracardiaca. Antes del sacrificio el día 21 post-inoculación, se realizaron radiografías de fémures y tibias. El esquema del experimento viene representado en la figura 2A.

5 En la figura 2B se representa gráficamente el efecto de los diferentes tratamientos sobre la supervivencia total libre de metástasis (curvas Kaplan-Meier). Mientras que en el tratamiento con p144 todos los animales habían muerto antes del día 27, y en el tratamiento control con vehículo todos habían muerto a los 19 días, todos los animales tratados con GM6001 y el grupo tratado con una combinación de p144 y GM6001 vivían más allá de los 29 días.

10 En la figura 2C se recoge gráficamente el efecto del tratamiento sobre la carga tumoral (número de células metastásicas) en los tejidos, cuantificada mediante medida de la luminiscencia (en los días 8, 15 y 19 desde la inoculación) producida por la expresión de la luciferasa en dichas células. Como puede observarse, en todos los animales se produce un aumento de la luminiscencia hasta el día 15. Entre el día 15 y 19 la luminiscencia se mantuvo o aumentó notablemente en los animales del grupo control o tratados con el péptido p144, mientras que aumentó suavemente en el grupo tratado con GM6001 y disminuyó ligeramente en el grupo que recibió una combinación de p144 y GM6001 como tratamiento.

20 Por último, se comprobó también que los diversos tratamientos disminuyeron el tamaño del área metastásica, porcentaje del área de metástasis frente al área total de hueso, respecto a los valores observados en los ratones control que habían sido tratados con el vehículo. El tratamiento con p144 no resultó en una disminución del área metastatizada estadísticamente significativa con respecto al vehículo. Sin embargo, el tratamiento con GM6001 resultó en una disminución del área de metástasis estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al vehículo. Sin embargo, la combinación de p144 y GM6001 produjo una disminución altamente significativa ( $p < 0,001$ ) con respecto a cualquiera de los tratamientos por separado de p144 y GM6001, comparados con el vehículo. (Fig. 2D). Estos resultados ponen de manifiesto que la combinación de GM6001 con p144 produce un efecto inhibitorio de la metástasis ósea muy superior a cualquiera de los tratamientos por separado.

25 El análisis de reconstrucción tridimensional de los huesos mediante  $\mu$ CT sustentaron los mismos resultados (Fig. 2E).

30 En conclusión, el tratamiento combinado con un péptido inhibidor de TGF $\beta$ 1 (p144) y un agente inhibidor de la actividad de MMPs (GM6001) inhibe la formación de metástasis en hueso en el cáncer de pulmón de manera mucho más eficiente que el tratamiento con uno solo de dichos inhibidores, lo que se traduce en una menor carga de metástasis (menor número de células metastásicas y menor área de metástasis) y finalmente en una mejora de la supervivencia libre de metástasis.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

- 5 (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1, seleccionado del grupo de: el péptido p144 (SEQ ID NO:6), el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4) y el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5), así como una variante de los péptidos p17(1-11), p17(1-12), p17(1-13) y p17(1-14) resultantes de su amidación y/o acetilación;
- 10 y
- (ii) al menos un inhibidor de MMP, seleccionado del grupo de: GM6001, ilomastat, marimastat, tetraciclinas, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocade, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (TIMP) 1, 2, 3 y 4,

15 en donde si el inhibidor de TGF $\beta$ 1 es un anticuerpo anti-TGF $\beta$ 1, el inhibidor de la MMP no es un derivado del ácido eláídico.

20 2. Una composición que comprende

- (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1, seleccionado del grupo de: el péptido p144 (SEQ ID NO:6), el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4) y el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5), así como una variante de los péptidos p17(1-11), p17(1-12), p17(1-13) y p17(1-14) resultantes de su amidación y/o acetilación;
- 25 (ii) al menos un inhibidor de MMP, seleccionado del grupo de: GM6001, ilomastat, marimastat, tetraciclinas, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocade, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (TIMP) 1, 2, 3 y 4; y
- 30 (iii) un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea.

35 3. Una composición según la reivindicación 2 en el que el agente para el tratamiento de la metástasis ósea es un bifosfonato o un derivado del mismo.

40 4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el inhibidor de TGF $\beta$ 1 se selecciona del grupo de los polipéptidos definidos por SEQ ID NO:1 a 6 y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.

5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el inhibidor de MMP es ilomastat.

45 6. Una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un carrier farmacéuticamente aceptable.

7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en medicina.

8. Uso de una composición farmacéutica que comprende

- 50 (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1, seleccionado del grupo de: el péptido p144 (SEQ ID NO:6), el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4) y el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5), así como una variante de los péptidos p17(1-11), p17(1-12), p17(1-13) y p17(1-14) resultantes de su amidación y/o acetilación;
- 55 (ii) al menos un inhibidor de MMP, seleccionado del grupo de: GM6001, ilomastat, marimastat, tetraciclinas, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocade, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (TIMP) 1, 2, 3 y 4; y
- 60 (iii) opcionalmente, un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de las metástasis.

65 9. Uso según la reivindicación 9 en la que la metástasis es una metástasis ósea.

10. Uso según la reivindicación 9 ó 10 en el que la metástasis se origina a partir de un cáncer de pulmón.

## ES 2 327 088 B1

11. Uso según la reivindicación 11 en el que el cáncer de pulmón es un cáncer no microcítico.

12. Uso de una composición farmacéutica que comprende

- 5 (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1, seleccionado del grupo de: el péptido p144 (SEQ ID NO:6), el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4) y el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5), así como una variante de los péptidos p17(1-11), p17(1-12), p17(1-13) y p17(1-14) resultantes de su amidación y/o acetilación;
- 10 (ii) al menos un inhibidor de MMP, seleccionado del grupo de: GM6001, ilomastat, marimastat, tetraciclinas, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocade, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la metaloproteínasa (TIMP) 1, 2, 3 y 4; y
- 15 (iii) opcionalmente, un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la hipercalcemia asociada a la metástasis ósea.

20

13. Uso de una composición farmacéutica que comprende

- 25 (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1, seleccionado del grupo de: el péptido p144 (SEQ ID NO:6), el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4) y el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5), así como una variante de los péptidos p17(1-11), p17(1-12), p17(1-13) y p17(1-14) resultantes de su amidación y/o acetilación;
- 30 (ii) al menos un inhibidor de MMP, seleccionado del grupo de: GM6001, ilomastat, marimastat, tetraciclinas, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocade, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la metaloproteínasa (TIMP) 1, 2, 3 y 4; y
- 35 (iii) opcionalmente, un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la resorción ósea asociada a la metástasis ósea.

40

14. Uso según las reivindicaciones 12 ó 13 en el que la metástasis se origina a partir de un cáncer de pulmón.

15. Uso según las reivindicaciones 12 ó 13 en el que el cáncer de pulmón es un cáncer no microcítico.

16. Uso según las reivindicaciones 8 a 15 en donde el inhibidor de TGF $\beta$ 1 se selecciona del grupo de los polipéptidos definidos por SEQ ID NO:1 a 6 y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.

45

17. Un kit que comprende en uno o varios contenedores

- 50 (i) una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1, seleccionado del grupo de: el péptido p144 (SEQ ID NO:6), el péptido p17 (SEQ ID NO:1), el péptido p17(1-11) (SEQ ID NO:2), el péptido p17(1-12) (SEQ ID NO:3), el péptido p17(1-13) (SEQ ID NO:4) y el péptido p17(1-14) (SEQ ID NO:5), así como una variante de los péptidos p17(1-11), p17(1-12), p17(1-13) y p17(1-14) resultantes de su amidación y/o acetilación;
- 55 (ii) una formulación farmacéuticamente aceptable de al menos un inhibidor de MMP, seleccionado del grupo de: GM6001, ilomastat, marimastat, tetraciclinas, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocade, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la metaloproteínasa (TIMP) 1, 2, 3 y 4; y
- 60 (iii) opcionalmente, una formulación farmacéuticamente aceptable de un tercer componente seleccionado del grupo de un agente quimioterapéutico o un agente para el tratamiento de la metástasis ósea.

18. Un kit según la reivindicación 17 que comprende, adicionalmente, instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de los distintos componentes.

65

19. Un kit según las reivindicaciones 17 ó 18 en donde el inhibidor de TGF $\beta$ 1 se selecciona del grupo de los polipéptidos definidos por SEQ ID NO:1 a 6 y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.

## ES 2 327 088 B1

20. Uso de un inhibidor de MMP para potenciar el efecto antimetastásico de un inhibidor de TGF $\beta$ 1.

21. Uso según la reivindicación 20 en donde el inhibidor de TGF $\beta$ 1 se selecciona del grupo de los polipéptidos definidos por SEQ ID NO:1 a 6 y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.

5

10

15

20

25

30

35

40

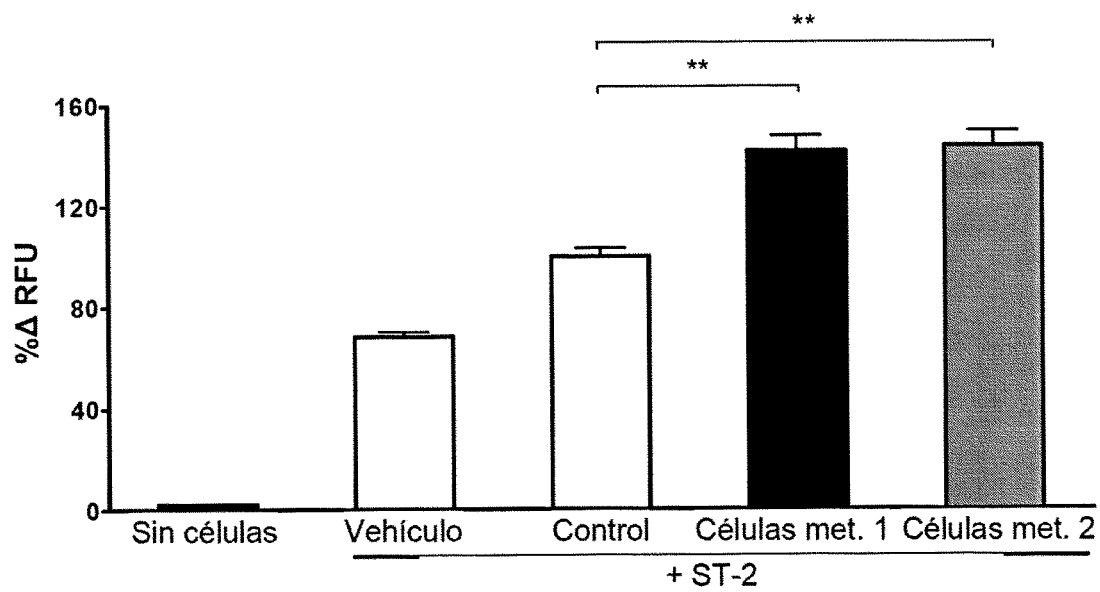
45

50

55

60

65



**FIGURA 1A**

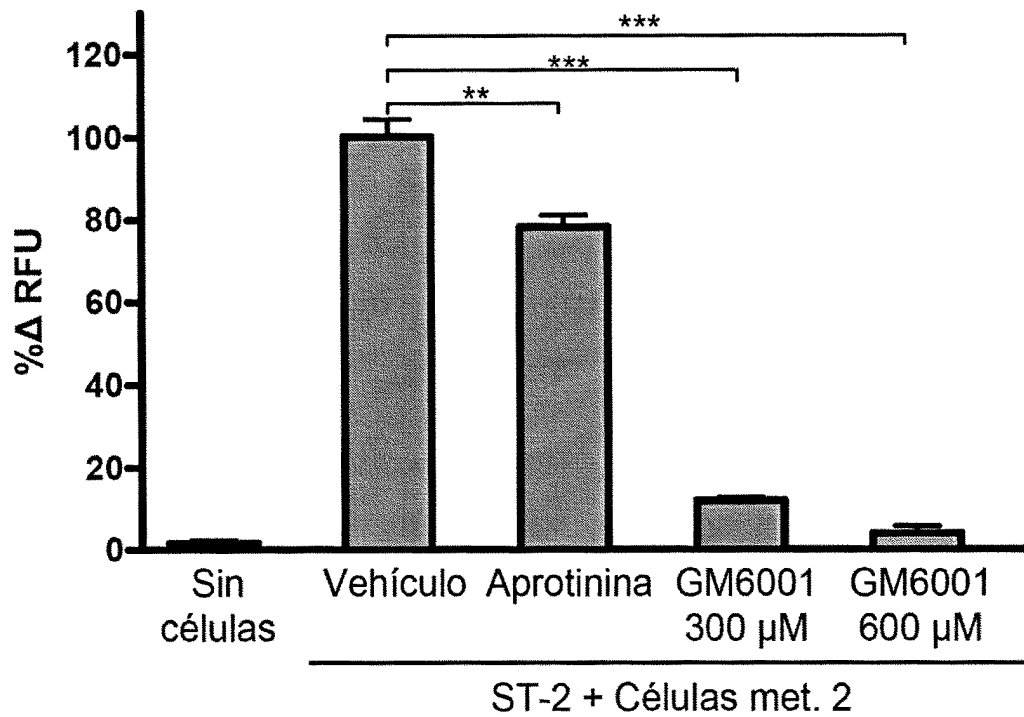
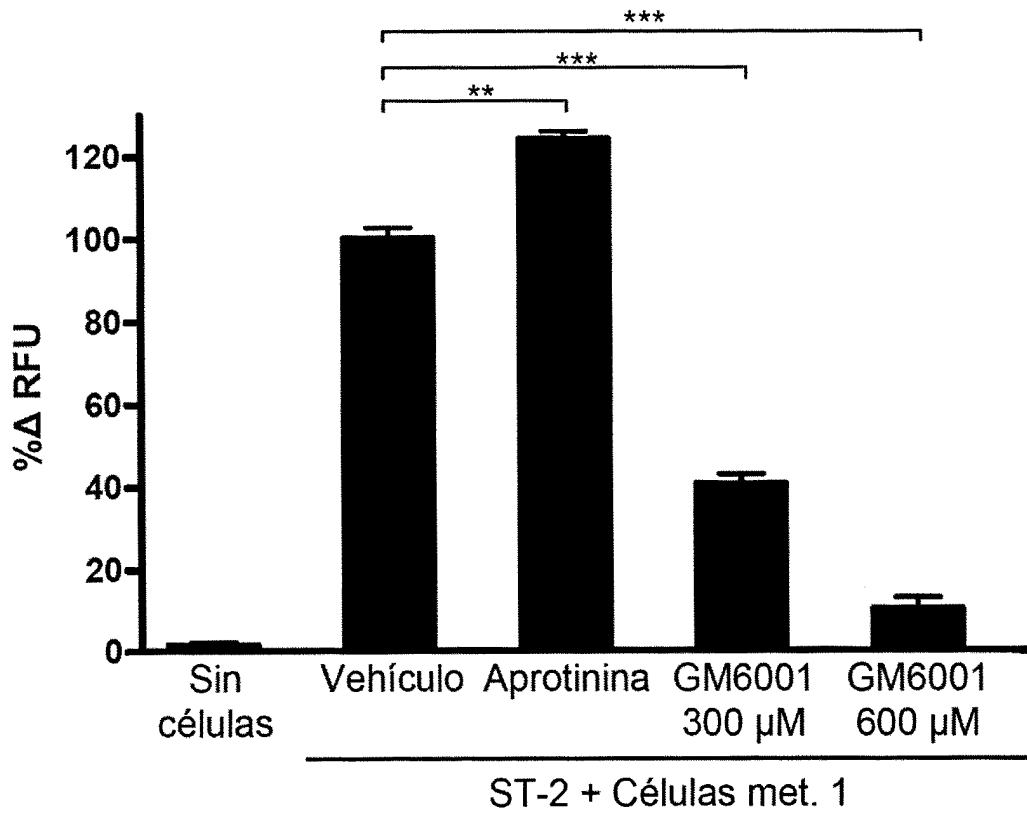
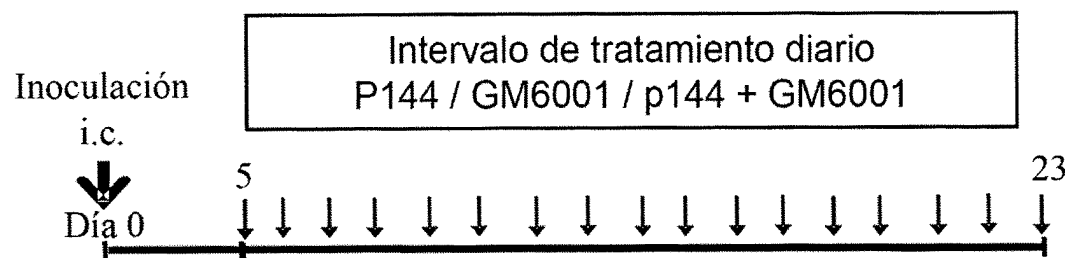
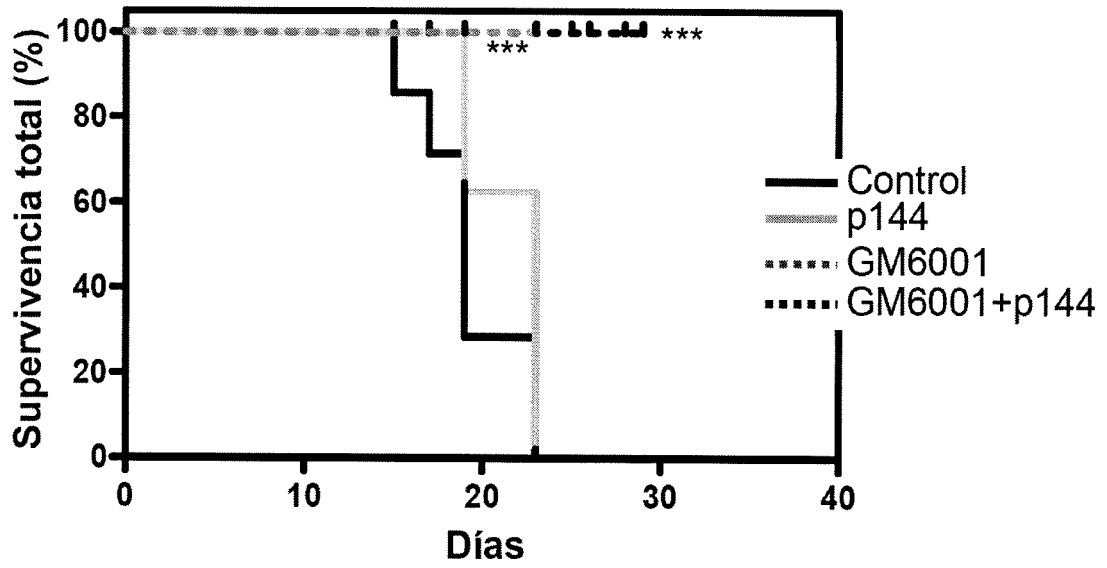


FIGURA 1B



**FIGURA 2A**



**FIGURA 2B**

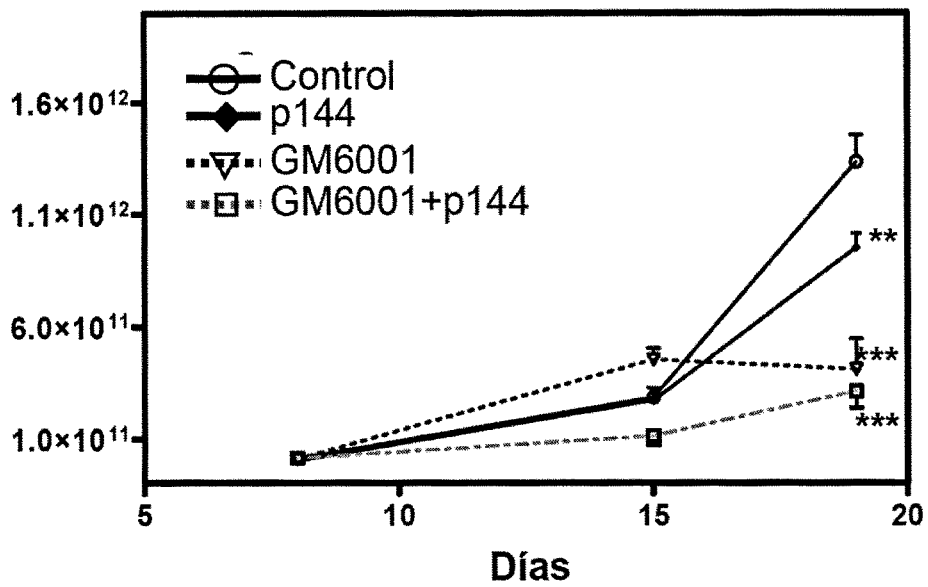
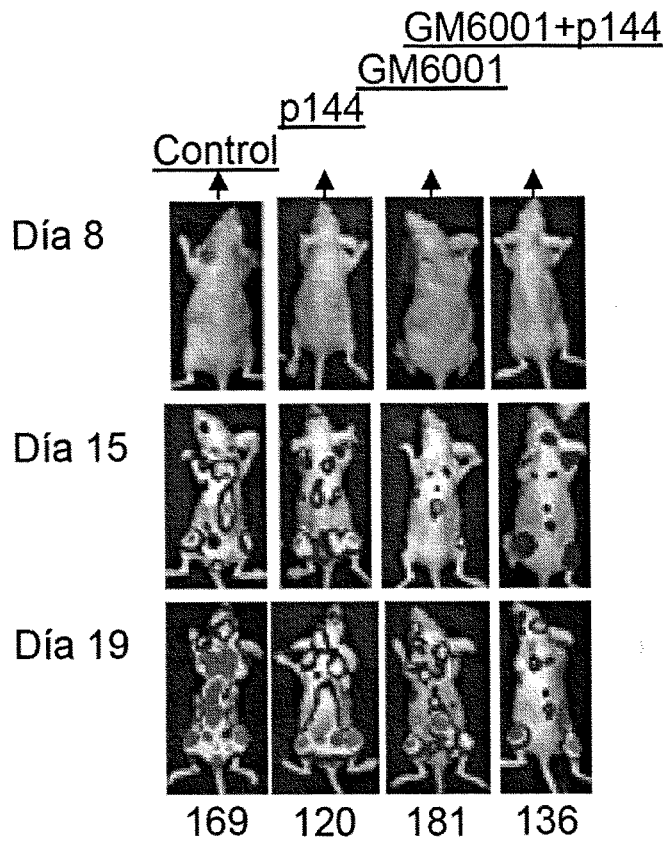


FIGURA 2C

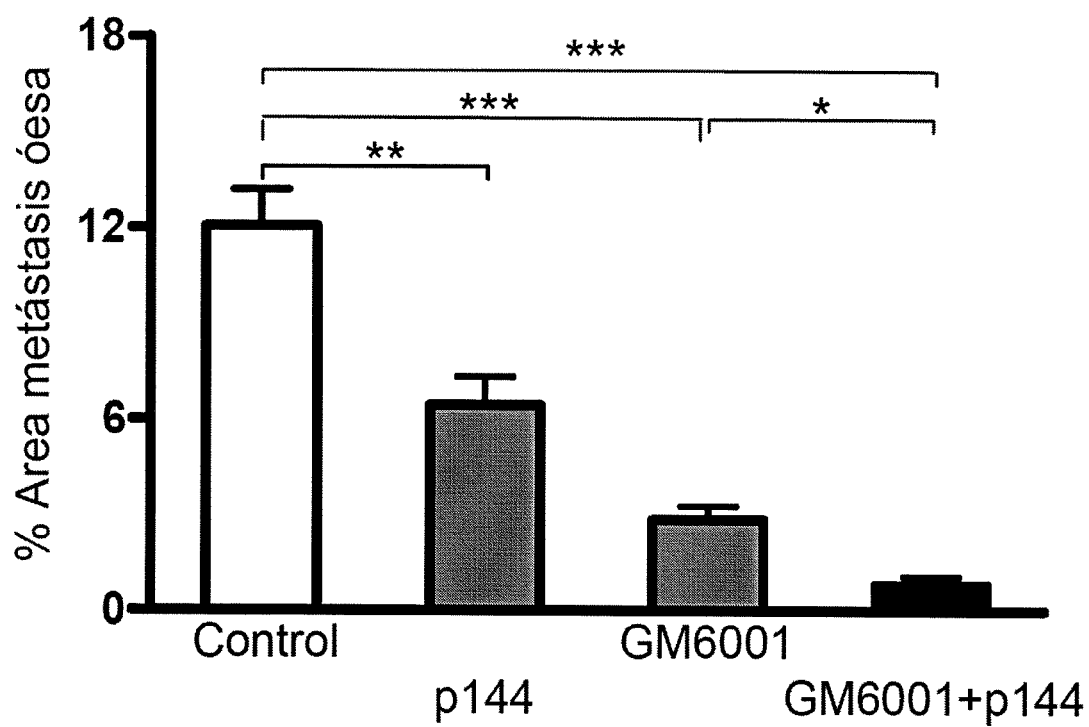
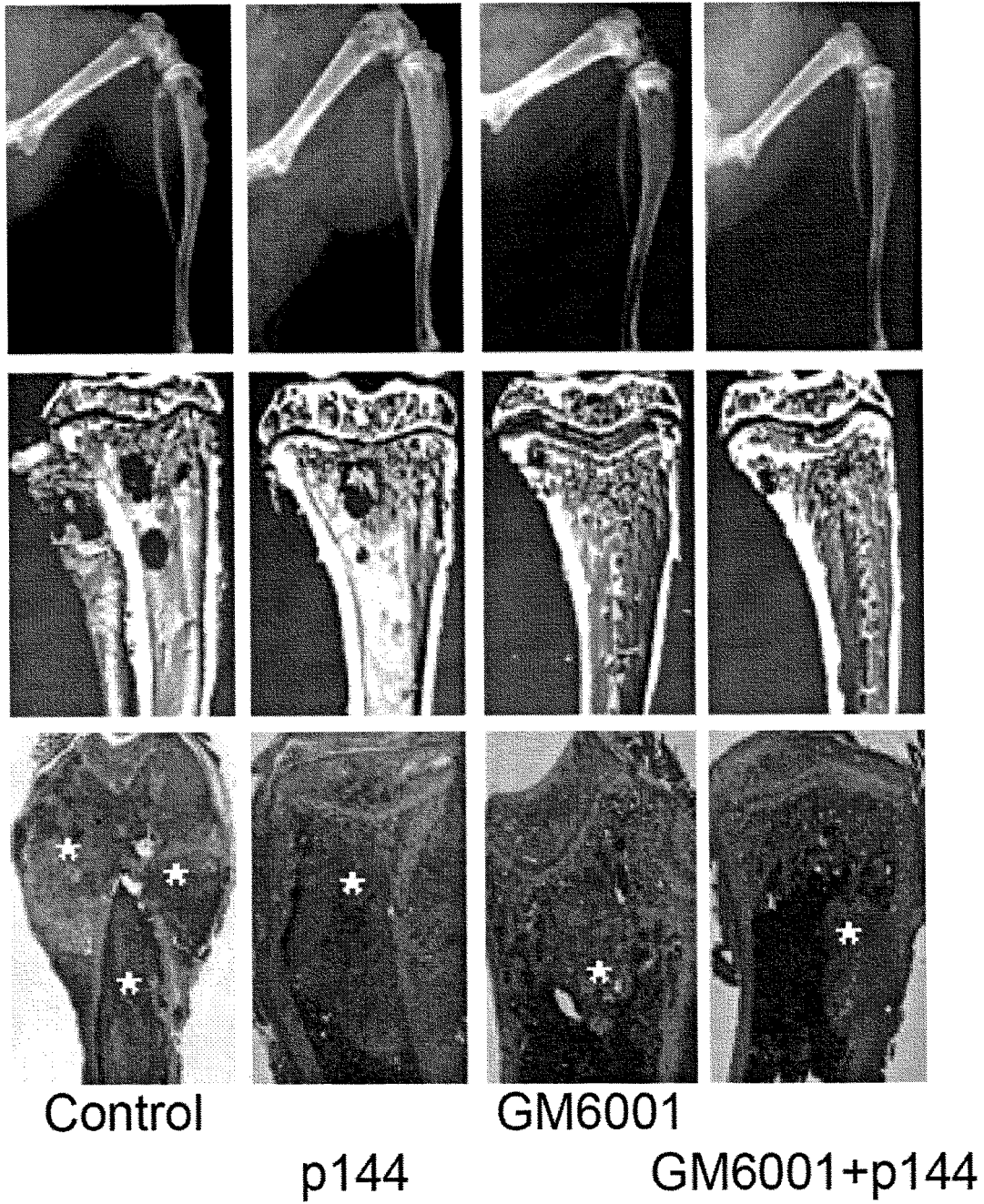


FIGURA 2D



**FIGURA 2E**

# ES 2 327 088 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Proyecto de biomedicina CIIMA

5 <120> COMBINACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LAS METÁSTASIS

<130> P3133ES00

10 <160> 6

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido p17

25 <400> 1

30 Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg Ala  
1 5 10 15

<210> 2

<211> 11

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido p17(1-11)

<400> 2

45 Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp  
1 5 10

<210> 3

50 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Péptido p17(1-12)

60 <400> 3

Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr  
1 5 10

65 <210> 4

<211> 13

# ES 2 327 088 B1

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido p17(1-13)

<400> 4

10

Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu  
1 5 10

15 <210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido p17(1-14)

25

<400> 5

Lys Arg Ile Trp Phe Ile Pro Arg Ser Ser Trp Tyr Glu Arg  
1 5 10

30

<210> 6

<211> 14

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Péptido p144

<400> 6

45

Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala Met Met Gln Asn  
1 5 10

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 327 088

② Nº de solicitud: 200702309

③ Fecha de presentación de la solicitud: **20.08.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/04** (2006.01)  
**A61P 35/04** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007048857 A1 (PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA S.L.) 03.05.2007, todo el documento.	1-21
A	EP 1568383 A2 (ANTISENSE PHARMA GMBH) 31.08.2005, t todo el documento. Citado en la solicitud.	1-21
A	WO 2005059133 A2 (ANTISENSE PHARMA GMBH) 30.05.2005, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-21
A	WO 0031135 A1 (INSTITUTO CIENTIFICO Y) 02.06.2000, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-21
A	WO 2005019244 A1 (FUNDACION PARA LA INVESTIGACION MEDICA APLICADA (FIMA)) 03.03.2005, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-21

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**  
07.10.2009

**Examinador**  
M. Hernández Cuéllar

**Página**  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,CAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE,EBI DATABASES

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.10.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1-21	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones		<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	1-21	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones		<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**Consideraciones:**

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007048857 A1	03.05.2007
D02	EP 1568383 A2	31.08.2005

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****2.1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento de la metástasis y, más particularmente, la metástasis ósea originada a partir de un cáncer de pulmón. Las composiciones objeto de la invención comprenden (i) al menos un inhibidor de TGF $\beta$ 1 seleccionado del grupo de péptidos codificados por las secuencias SEQ ID NOS 1-6 y (ii) al menos un inhibidor de MMP seleccionado del grupo de: GM6001, ilomastat, marimastat, tetraciclina, prinomastat, batimastat, solimastat, tanomastat, trocader, AG3340, BMS-275291, neovastat, inhibidores tisulares de la proteinasa (TIMP) 1,2,3,4.. En la realización preferida los inhibidores de TGF $\beta$ 1 se seleccionan de un grupo de péptidos definidos por las SEQ ID NOS 1-6 y el inhibidor de MMP es ilomastat. La invención también proporciona métodos y kits basados en la composición de la invención para el tratamiento o la prevención de las metástasis, particularmente de las metástasis óseas, para el tratamiento o prevención de la hipercalcemia asociada a la metástasis ósea y para el tratamiento o prevención de la resorción ósea asociada a la metástasis ósea.

Los documentos D01 y D02 establecen el estado de la técnica más cercano a la invención de la presente solicitud. En D01 se describe el uso de los péptidos p17 y p144 (cuyas secuencias habían sido divulgadas en anteriores documentos de patente) como agentes moduladores de la respuesta inmune y a la utilización de dichos agentes en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de determinadas patologías, entre ellas el cáncer. El documento D02 describe composiciones farmacéuticas que inhiben la formación de metástasis en los tratamientos de cáncer. Estas composiciones están basadas en oligonucleótidos antisentido que inhiben la síntesis de proteínas implicadas en la formación de metástasis. Entre estas proteínas se encuentra el TGF $\beta$ 1 y las MMPs pero no se especifica ningún ejemplo concreto en el que se asocien oligonucleótidos antisentido correspondientes a ambas proteínas, ni se sugiere la posible acción sinérgica de dicha combinación.

A la luz de la información técnica divulgada en D01 y D02 esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-21, cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva.