



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 161**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07724281 .6**

96 Fecha de presentación : **05.04.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2007415**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **Combinación de una proteína de fusión entre un anticuerpo contra el dominio EDB de la fibronectina e IL2 con una pequeña molécula adicional.**

30 Prioridad: **07.04.2006 EP 06090054**  
**03.05.2006 US 796866 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2011**

73 Titular/es: **PHILOGEN S.p.A.**  
**Piazza La Lizza, 7**  
**53100 Siena, IT**

72 Inventor/es: **Menssen, Hans Dietrich;**  
**Menrad, Andreas y**  
**Wagner, Karola**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 352 161 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

[0001] La invención se refiere a una combinación de (i) una proteína de fusión que comprende una parte de interleucina 2 y una parte de anticuerpo que reconoce específicamente el dominio extra B de la fibronectina (ED-B-fibronectina) y (ii) 5 gemcitabina, y a su uso para el tratamiento del cáncer, en particular del cáncer de páncreas, como se expone en las reivindicaciones.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

[0002] El adenocarcinoma de páncreas constituye la quinta causa de muerte relacionada con cáncer en los países occidentales industrializados (Parker SL, Tong T, 10 Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. CA Cancer J Clin 1997; 47:5-27). El pronóstico para los pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer de páncreas es extremadamente malo, con una tasa de supervivencia global estimada a 5 años de tan solo 1 a 4%. La extirpación quirúrgica es el único tratamiento potencialmente curativo, pero en la mayoría de los casos la extensión local o la enfermedad metastásica excluye 15 el tratamiento quirúrgico (Rosewicz S, Wiedenmann B. Pancreatic carcinoma. Lancet 1997; 349:485-489; Cohen SJ, Pinover WH, Watson JC, Meropol NJ. Pancreatic cancer. Curr Treat Options Oncol 2000; 1:375-386). Además, las estrategias paliativas actualmente disponibles influyen poco en el curso agresivo de este neoplasma, alcanzándose unas tasas de respuesta objetiva inferiores al 20% con una pésima 20 supervivencia media de 4 a 6 meses (Burriss HA, III, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol 1997; 15:2403-2413). Los 25 agentes quimioterapéuticos y las radioterapias actuales se basan en que las células tumorales, por su naturaleza, se dividen rápidamente, por lo que su selectividad es baja. La toxicidad inaceptable para las células proliferativas no malignas limita la escalada de dosis e impide la administración de una dosis curativa. Además, la mayoría de los agentes quimioterapéuticos no se acumula con preferencia en el lugar del tumor 30 (Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, Kroemer HK, Gesson JP, Koch M, Monneret C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. Cancer Res 1998; 58:1195-1201). Debido a la alta presión intersticial y la vasculatura tumoral irregular, los agentes quimioterapéuticos no consiguen alcanzar niveles adecuados en el tumor (Folli S, Pelegri A, Chalandon 35 Y, Yao X, Buchegger F, Lienard D, Lejeune F, Mach JP. Tumor-necrosis factor can

enhance radio-antibody uptake in human colon carcinoma xenografts by increasing vascular permeability. *Int J Cancer* 1993; 53:829-836; Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 1987; 47:3039-3051). Sin embargo, el desarrollo clínico de TNF $\alpha$  sistémico no prosperó porque las dosis necesarias para  
5 obtener un efecto anticanceroso estaban asociadas a una toxicidad inaceptable (Jones AL, Selby P. Tumor necrosis factor: clinical relevance. *Cancer surveys* 1989; 8:817-836). Una manera prometedora de salvar estos obstáculos consiste en el suministro dirigido de agentes terapéuticos al microentorno del tumor por medio de ligandos específicos de antígeno, por ejemplo de anticuerpos específicos de marcadores  
10 asociados a tumores. En particular, tener como objetivo marcadores asociados a la angiogénesis tumoral constituye una estrategia terapéutica atractiva por numerosas razones. En primer lugar, las dianas que se expresan selectivamente alrededor de la neovasculatura tumoral y en el estroma tumoral son fácilmente accesibles a derivados de anticuerpos administrados por vía intravenosa. En segundo lugar, los marcadores de  
15 neovasculatura son producidos típicamente por células endoteliales y/o fibroblastos, que son más estables genéticamente que las células tumorales. En tercer lugar, puesto que la angiogénesis es un requisito previo para el crecimiento tumoral y la metástasis, el suministro selectivo de agentes tóxicos a los vasos sanguíneos de nueva formación debería ofrecer un beneficio terapéutico. Por último, puesto que la angiogénesis, es  
20 decir, el crecimiento de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes, es característica de todos los tumores sólidos agresivos, estas dianas pueden considerarse antígenos pantumorales (Halin C, Zardi L, Neri D. Antibody-based targeting of angiogenesis. *News Physiol Sci* 2001; 16:191-194; Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654:39-49).

25 **[0003]** Uno de los marcadores oncofetales asociados a la neoangiogénesis y el remodelado tisular más selectivo conocido hasta la fecha es el dominio extra B (ED-B) de la fibronectina (FN) (Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer*. 1 de diciembre de 1994; 59(5):612-8. Errata en:  
30 *Int J Cancer*, 4 de julio de 1995; 62(1):118). Las FN son componentes de la matriz extracelular (MEC) de alto peso molecular que se expresan abundantemente en una serie de tejidos sanos y líquidos corporales. Se pueden generar varias isoformas de FN diferentes por empalme alternativo a nivel del transcrito primario. El ED-B, un pequeño dominio de 91 aminoácidos, cuya secuencia es idéntica en hombres y ratones,  
35 habitualmente está ausente en la fibronectina plasmática y tisular, excepto en algunos

vasos sanguíneos del endometrio regenerativo y los ovarios (Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1654:39-49; Viti F, Tarli L, Giovannoni L, Zardi L, Neri D. Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res* 1999; 59:347-352). Sin embargo, puede insertarse en la molécula de fibronectina durante el remodelado tisular activo asociado a la neoangiogénesis, acumulándose de este modo alrededor de la neovasculatura y en el estroma de los tumores malignos y en otros tejidos sometidos a remodelado y angiogénesis. Recientemente se han generado numerosos anticuerpos de alta calidad específicos del dominio ED-B de la fibronectina. En particular, se ha verificado que el fragmento de anticuerpo humano scFv(L19) de cadena sencilla Fv, que muestra una afinidad de unión picomolar por ED-B, se dirige selectivamente a la neovasculatura tumoral tanto en modelos de tumores experimentales (Viti F, Tarli L, Giovannoni L, Zardi L, Neri D. Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res* 1999; 59:347-352) como en pacientes con cáncer (Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, Leprini A, Borsi L, Castellani P, Zardi L, Neri D, Riva P. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9:571-579), preparando así el terreno para el suministro selectivo de agentes terapéuticos a la neovasculatura tumoral. En este contexto, la interleucina 2 (IL-2) ha sido caracterizada como una de las citocinas antitumorales más potentes. Exhibe un conjunto de efectos reguladores inmunológicos, que incluyen la estimulación de diversas células efectoras antitumorales (Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med* 2001; 250:462-475). Sin embargo, pese a que ha sido autorizada para el tratamiento clínico del carcinoma metastásico de células renales, la administración sistémica de IL-2 no ha demostrado tener el éxito que se esperaba. La eficacia terapéutica de la IL-2 administrada de forma sistémica se ve mermada por sus serios efectos secundarios potencialmente amenazadores para la vida (por ejemplo hipotensión ortostática, síndrome de extravasación capilar y malestar profundo) que limitan la escalada de dosis e impiden la administración de una dosis curativa (Bubenik J, Den Otter W, Huland E. Local cytokine therapy of cancer: interleukin-2, interferons and related cytokines. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49:116-122; Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Vitetta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to

endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:3957-3962). Además, la rápida degradación o eliminación de la IL-2 administrada de forma sistémica reduce adicionalmente su eficacia. Por otra parte, la administración local de IL-2 ha tenido más éxito y ha logrado controlar los derrames malignos y obtener una remisión significativa de las lesiones establecidas (Bubenik J, Den Otter W, Huland E. Local cytokine therapy of cancer: interleukin-2, interferons and relates cytokines. Cancer Immunol Immunother 2000; 49:116-122; Den Otter W, Dobrowolski Z, Bugajski A, Papla B, Van Der Meijden AP, Koten JW, Boon TA, Siedlar M, Zembala M. Intravesical interleukin-2 in T1 papillary bladder carcinoma: regression of marker lesion in 8 of 10 patients. J Urol 1998; 159:1183-1186; Baselmans AH, Koten JW, Battermann JJ, Van Dijk JE, Den Otter W. The mechanism of regression of solid SL2 lymphosarcoma after local IL-2 therapy. Cancer Immunol Immunother 2002; 51:492-498; Krastev Z, Koltchakov V, Popov D, Alexiev A, Koten JW, Den Otter W. A case of hepatocellular carcinoma (HCC): treatment with local application of alcohol and interleukin 2 (IL-2). Hepatogastroenterology 2003; 50:1647-1649). A este respecto, el transporte dirigido de la citocina IL-2 al microentorno del tumor, conjugándola al scFvL19 específico de EDB de FN, parece constituir un concepto atractivo para potenciar el índice terapéutico de la IL-2 y, al mismo tiempo, disminuir sus efectos secundarios tóxicos. Usando modelos murinos subcutáneos de teratocarcinoma, cáncer pulmonar de células pequeñas y adenocarcinoma de colon se ha verificado previamente que el suministro de IL-2 mediado por L19 al microentorno del tumor aumenta el rendimiento terapéutico de esta citocina (Carnemolla B, Borsi L, Balza E, Castellani P, Meazza R, Berndt A, Ferrini S, Kosmehl H, Neri D, Zardi L. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. Blood 2002; 99:1659-1665).

**[0004]** Los tumores no pueden crecer más allá de una cierta masa sin que se formen nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y se ha descrito para una serie de tumores una correlación entre la densidad de microvasos y la invasividad del tumor (Folkman (1995) Nat. Med., vol. 1, pág. 27). Las moléculas capaces de dirigirse selectivamente a los marcadores de la angiogénesis ofrecen oportunidades clínicas para el diagnóstico y el tratamiento de tumores y de otras enfermedades caracterizadas por una proliferación vascular, tales como artritis reumatoide, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad (O'Reilly y col. (1996) Nat. Med., vol. 2, pág. 689 en adelante; O'Reilly y col. (1997) Cell, vol. 88, pág. 277 en adelante; Friedlander y col. (1995) Science, vol. 270, pág. 1500 en adelante; Pasqualini y col.

(1997) Nat. Biotechnol. vol 15, pág. 542 en adelante; Huang y col. (1997) Science, vol. 275, pág. 547 en adelante; Kim y col. (1993) Nature, vol. 362, pág. 841 en adelante; Schmidt - Erfurth y col. (1997) Br. J. Cancer, vol. 75, pág. 54 en adelante).

**[0005]** El documento EP 0122707 describe nucleósidos que contienen grupos difluoro-carbohidrato para el tratamiento de virus. El documento EP 0184365 describe el uso de gemcitabina (1-(4-amino-2-oxo-1H-pirimidin-1-il)-2-desoxi-2,2-difluororribosa o 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina) como medicamento para el tratamiento de neoplasmas susceptibles. La síntesis de gemcitabina se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0184365 y EP 727433. Por el término "gemcitabina" deben entenderse tanto la 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina como sus sales fisiológicamente aceptables, en particular la sal de clorhidrato de la misma. La sal de clorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina se encuentra disponible en el mercado bajo el nombre comercial Gemzar.

**[0006]** El cáncer de páncreas es un cáncer quimiorresistente, y la radioterapia independiente del cáncer de páncreas no produce un beneficio de supervivencia en el paciente. Varios ensayos clínicos describen la combinación de radioterapia y gemcitabina (Blackstock A.W. y col., J. Clin. Oncol. 17:2208-2212, 1999; Mose S. y col., Strahlenther Onkol. vol. 178, páginas 59-70, 2002). El uso de gemcitabina como radiosensibilizador en combinación con radioinmunoterapia con anticuerpos para el tratamiento del cáncer de páncreas se ha investigado en varios modelos animales. Gold DV y col. (Clin. Can. Res., vol. 9, 3929s-3937s, 2003) describen el uso de anticuerpos monoclonales marcados con Y-90 e I-131 y dirigidos a la mucina MUC1 en combinación con gemcitabina. El tratamiento combinado mejoró significativamente la eficacia terapéutica.

**[0007]** La interleucina-2 (IL-2), una citocina con cuatro hélices alfa agrupadas, producida por las células T auxiliares 1, desempeña un papel esencial en las fases de activación de las respuestas inmunes tanto específicas como naturales (Taniguchi y col. (1993) Cell, vol. 73, páginas 5-8). La IL-2 promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B activados y de las células asesinas naturales (NK) e induce la actividad de las células T citotóxicas (CTL) y la citotoxicidad antitumoral de NK / células asesinas activadas por linfocinas (LAK). La IL-2 se ha usado en abordajes inmunoterapéuticos de varios tumores humanos (Rosenberg (1992) J. Clin. Oncol., vol. 10, páginas 180-199). La administración de IL-2 recombinante (rIL-2) sola o en combinación con células linfoides adoptivas transferidas dio lugar a una regresión de los tumores establecidos tanto en modelos animales como en

pacientes. Sin embargo, su eficacia terapéutica *in vivo* está limitada por su rápido aclaramiento y, a dosis elevadas, por la alta toxicidad, relacionada principalmente con el síndrome de extravasación capilar (Siegel y Puri (1991) Interleukin-2 toxicity, en J. Clin. Oncol., vol. 9, páginas 694-704). El suministro de IL-2 al lugar del tumor por medio de un anticuerpo dirigido a un marcador tumoral de la superficie celular posiblemente permita alcanzar concentraciones locales activas de IL-2, así como reducir las toxicidades asociadas a la administración sistémica (Lode y col. (1998) Pharmacol. Ther., vol. 80, páginas 277-292).

**[0008]** La presencia de IL-2 unida a la superficie de una célula tumoral produce la activación y/o el direccionamiento de células efectoras del sistema inmune, bien de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> o bien de células asesinas naturales (NK), y la inducción de una respuesta inmune antitumoral eficaz. Las células T o NK reciben una primera señal a través de receptor(es) (por ejemplo el receptor de células T para las células T) que reconoce(n) específicamente los ligandos apropiados en la superficie de la célula tumoral, y una segunda señal a través de las cadenas receptoras de IL-2 emitida por la IL-2, localizada igualmente en la superficie de la célula tumoral (Lode y col., 1999, PNAS USA, 96: 8591-8596 y las referencias allí citadas).

**[0009]** El dominio ED-B de la fibronectina, una secuencia de 91 aminoácidos idéntica en ratones, ratas y seres humanos, insertada por corte y empalme alternativo en la molécula de fibronectina, se acumula específicamente alrededor de estructuras neovasculares y representa una diana para la intervención molecular (Zardi y col (1987) EMBO J. vol. 6, páginas 2337-2342; Carnemolla y col. (1989) J. Cell Biol., vol. 108, páginas 1139-1148, asimismo Castellani y col. (1994) Int. J. Cancer, vol. 59, páginas 612-618). Usando el anticuerpo recombinante humano L19 dirigido contra el dominio ED-B se ha demostrado en diferentes modelos de tumores la posibilidad de un direccionamiento *in vivo* hacia la neovasculatura (Tarli y col. (1999) Blood, vol. 94, páginas 192-198; Viti y col. (1999) Cancer Res., vol. 347).

**[0010]** En el documento WO 97/45544 se describen anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el dominio ED-B de la fibronectina.

**[0011]** En el documento WO 99/58570 se describe el anticuerpo monoclonal L19.

**[0012]** La proteína de fusión L19IL2 se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/62298. El documento WO 01/62298, página 8, línea 12, hace referencia a las secuencias de los dominios L19 VH y L19 VL descritas en Pini y col. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776. Piri y col. describen partes de la secuencia de L19 en la tabla II de la página 21772. L19 presenta el número de acceso EMBL AJ 006113.

[0013] Existe una gran demanda médica de un medicamento para tratar eficazmente el cáncer de páncreas. La presente invención proporciona medicamentos nuevos y eficaces que son adecuados para el tratamiento de los cánceres de páncreas. Se puede usar una proteína de fusión en la preparación de un medicamento para el

5 tratamiento del cáncer de páncreas,

en el que la proteína de fusión comprende

una parte de anticuerpo

que reconoce específicamente el dominio ED-B de la fibronectina, y

una parte de interleucina-2.

10 [0014] Una realización de la presente invención se refiere a una combinación que comprende al menos una proteína de fusión y gemcitabina,

en la que la proteína de fusión comprende

una parte de anticuerpo

que reconoce específicamente el dominio ED-B de la fibronectina, y

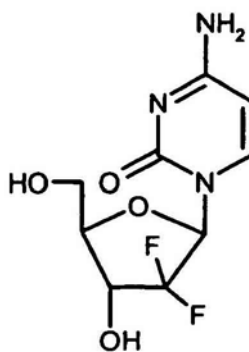
15 una parte de interleucina-2, proporcionándose la combinación para el uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer.

[0015] Por el término “gemcitabina” debe entenderse tanto 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina como sus sales fisiológicamente aceptables, en particular la sal de

clorhidrato de la misma. La sal de clorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina se

20 encuentra disponible en el mercado bajo el nombre comercial Gemzar.

[0016] La gemcitabina, en su forma básica, presenta la fórmula



[0017] Los inventores observaron una sobreexpresión selectiva de ED-B FN en el carcinoma de páncreas humano, como se determinó por inmunohistoquímica, mientras

25 que no se pudo detectar ED-B FN en tejido pancreático humano no transformado ni de pancreatitis crónica. En analogía a la situación humana, se confirmó un patrón de expresión de ED-B FN cualitativa y cuantitativamente comparable tanto en los tumores de páncreas primarios como en las metástasis hepáticas y de nódulos linfáticos de los

modelos ortotópicos de ratón investigados en este estudio.

**[0018]** Usando estos modelos de ratón como modelos *in vivo* clínicamente representativos, los inventores han demostrado sorprendentemente que la administración de L19IL2 inhibe eficazmente el crecimiento de los tumores de páncreas primarios establecidos y reduce o elimina las metástasis en los nódulos linfáticos, mientras que la IL-2 no dirigida produce poco o ningún efecto terapéutico. Igualmente, la actividad antitumoral de L19IL2 estaba mediada exclusivamente por IL-2, como se muestra mediante la administración del fragmento de anticuerpo scFvL19 solo, con el que no se obtuvo ningún beneficio terapéutico. El modesto rendimiento de la IL-2 no dirigida no es sorprendente, considerando la observación de que la mayoría de los agentes anticancerosos muestra unas relaciones tumor/ órgano < 1, en algunos casos incluso 1:20, después de la inyección intravenosa (Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, Kroemer HK, Gesson JP, Koch M, Monneret C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. Cancer Res 1998; 58:1195-1201).

**[0019]** Este es el primer estudio que demuestra la eficacia terapéutica de L19IL2 en el contexto del carcinoma de páncreas. Además, los inventores han demostrado por primera vez el poder terapéutico de L19IL2 en el control de la enfermedad metastásica, usando un modelo ortotópico de ratón fisiopatológicamente relevante para el cáncer de páncreas. Cabe señalar que el efecto inhibitor del crecimiento ejercido por L19IL2 no era específico de un tipo celular pero se pudo establecer en dos modelos de ratón diferentes para el cáncer de páncreas, si bien éstos mostraban niveles de expresión de ED-B cuantitativamente diferentes.

**[0020]** Los datos de los inventores indican asimismo que L19IL2 solo puede inhibir el crecimiento del cáncer de páncreas en mayor medida que la gemcitabina, un agente quimioterapéutico de primera línea convencional disponible para el tratamiento del cáncer de páncreas humano. De hecho, dos administraciones de L19IL2 fueron suficientes para reducir la masa tumoral en ratones con cáncer de páncreas a tan solo el 25% de la observada en los controles. La promesa clínica y el alcance de la terapia con L19IL2 se manifestaron en la inducción de una remisión completa y la ausencia de recidiva tumoral en el 40% de los ratones con cáncer de páncreas que sobrevivieron a largo plazo.

**[0021]** Además, se obtuvieron resultados terapéuticos sorprendentemente positivos en el tratamiento de ratones con tumores con una terapia combinada de L19IL2 más clorhidrato de gemcitabina: se observó una inhibición del 97% en el

crecimiento del tumor de páncreas primario, e incluso un 70% de remisiones completas.

**[0022]** Los mecanismos subyacentes a la actividad antitumoral de la IL-2 todavía no se entienden del todo. Para examinar esta cuestión los inventores llevaron a cabo 5 investigaciones histológicas. Una de las características más intrigantes de los tumores tratados con L19IL2 era la extensa necrosis tumoral. El grado de necrosis y su localización en la parte central del tejido tumoral, en la que se observó solo una escasa infiltración de leucocitos, sugieren más bien unos mecanismos subyacentes distintos de la muerte de células tumorales causada por el contacto directo célula-célula de células 10 NK, macrófagos u otras células efectoras inmunológicas. De hecho, evidencias recientes indican que la inducción dependiente de IL-2 de una necrosis tumoral masiva tras la administración local de IL-2 se debe al síndrome de extravasación capilar local, que puede ser provocado por linfocitos y óxido nítrico producido por células efectoras inmunológicas activadas por IL-2 (De Mik HJ, Koten JW, Maas RA, Dullens HF, Den 15 Otter W. Tumour regression by IL-2 mediated stagnation of blood flow. *In Vivo* 1991; 5:679-684; Sakkoula E, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME. Involvement of nitric oxide in the inhibition of angiogenesis by interleukin-2. *Br J Pharmacol* 1997; 122:793-795) y/o por efectos citotóxicos directos de la IL-2 (Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Vitetta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 20 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:3957-3962) y de células NK activadas sobre el endotelio (Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti- tumour activity. *Trends Immunol* 2003; 24:603-609; Di 25 Carlo E, Meazza R, Basso S, Rosso O, Comes A, Gaggero A, Musiani P, Santi L, Ferrini S. Dissimilar anti- tumour reactions induced by tumour cells engineered with the interleukin-2 or interleukin-15 gene in nude mice. *J Pathol* 2000; 191:193-201). Teniendo en cuenta que las células endoteliales migran a lo largo de estructuras de la MEC que contienen ED-B FN (Tarli L, Balza E, Viti F, Borsi L, Castellani P, 30 Berndorff D, Dinkelborg L, Neri D, Zardi L. A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood* 1999; 94:192-198) y que la IL-2 es suministrada selectivamente a la MEC por su unión a scFvL19, la contribución de los efectos citotóxicos directos de la IL-2 sobre las células endoteliales a la necrosis y regresión tumorales dependientes de IL-2 ofrece una hipótesis extremadamente atractiva. 35 Aunque se ha descrito que la IL-2 ejerce citotoxicidad sobre las células endoteliales,

esta citocina curiosamente no actúa directamente sobre las células cancerosas, que pueden crecer sin impedimento *in vitro* a altas concentraciones de IL-2 (Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. J Intern Med 2001; 250:462-475). No obstante, las muestras tumorales de ratones tratados con L19IL2 revelaron una disminución considerable en el número de células proliferativas, como se muestra en el análisis inmunohistoquímico para la expresión de Ki67.

**[0023]** Respecto a la posibilidad de que las células efectoras inmunológicas medien la regresión tumoral inducida por L19IL2, los inventores han observado en ensayos inmunohistoquímicos un aumento cuádruple, provocado por L19IL2, en el número de macrófagos que infiltran el tumor. Esta observación coincide con la noción de que los macrófagos responden a la estimulación por IL-2 con actividad tumoricida y producción de citocinas y factores de crecimiento. Además, se ha establecido que la reducción de macrófagos atenúa la eficacia terapéutica de la IL-2 (Masztalerz A, Van Rooijen N, Den Otter W, Everse LA. Mechanisms of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12 mediated tumour regression. Cancer Immunol Immunother 2003; 52:235-242). Sin embargo, la reducción de macrófagos no fue capaz de abrogar por completo la actividad antitumoral de la IL-2, lo que apunta a la contribución de mecanismos adicionales. Según este concepto, en el estudio realizado por los inventores se observó una presencia mucho mayor (70 veces) de células NK en los tumores tratados con L19IL2. El significado funcional de la infiltración de células NK en los tejidos tumorales para la respuesta antitumoral estimulada por IL-2 fue corroborado por la observación de que la reducción de células NK abolía por completo el efecto terapéutico de L19IL2 sobre el cáncer de páncreas. Además, la siguiente serie de evidencias apoyan los datos de los inventores:

(i) Se han demostrado *in vitro* e *in vivo* efectos antitumorales prometedores además de la extravasación e infiltración de tejidos tumorales por células NK, (ii) las células NK se han considerado la subpoblación de leucocitos estimulados predominantemente por IL-2 recombinante en los marcos preclínico y clínico (Basse PH, Whiteside TL, Herberman RB. Use of activated natural killer cells for tumor immunotherapy in mouse and human. Methods Mol Biol 2000; 121:81-9; Janssen RA, Slejifer DT, Heijn AA, Mulder NH, The TH, de Leij L. Peripheral blood lymphocyte number and phenotype prior to therapy correlate with response in subcutaneously applied rIL-2 therapy of renal cell carcinoma. Br J Cancer 1992; 66:1177-1179).

**[0024]** Por lo tanto, los inventores han establecido la proteína de fusión

recombinante L19IL2 como agente anticanceroso novedoso, altamente eficaz y específico para el tratamiento del cáncer de páncreas en modelos ortotópicos de ratones sin pelo y han caracterizado los mecanismos inmunológicos y no inmunológicos subyacentes.

5 **[0025]** Además, los datos preclínicos de los inventores apoyan con vehemencia la iniciación de estudios clínicos usando la inmunocitocina L19IL2 en el cáncer de páncreas.

**[0026]** En una realización preferida, la proteína de fusión presenta una parte de anticuerpo N-terminal y una parte de interleucina-2 C-terminal, o la proteína de fusión  
10 presenta una parte de interleucina-2 N-terminal y una parte de anticuerpo C-terminal.

**[0027]** En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende un conector que conecta la parte de anticuerpo y la parte de interleucina-2.

**[0028]** La parte de anticuerpo es preferentemente humana.

**[0029]** En una realización preferida, la parte de anticuerpo que reconoce  
15 específicamente el dominio ED-B de la fibronectina se une con una afinidad sub-nanomolar. Para una revisión de las definiciones y mediciones de la afinidad anticuerpo-antígeno, véase Ned y col. (1996). Trends in Biotechnol. 14, 465-470.

**[0030]** En una realización preferida, la parte de anticuerpo contiene al menos uno de los CDR del anticuerpo L19, preferentemente contiene todas las secuencias CDR  
20 del anticuerpo L19.

**[0031]** En una realización preferida, la parte de anticuerpo comprende al menos una de las SEQ ID NO: 6 a 11. Preferentemente, el anticuerpo comprende las secuencias según las SEQ ID NO: 6 a 11.

**[0032]** En otra realización preferida, la parte de anticuerpo comprende al menos  
25 una cadena pesada V según la SEQ ID NO: 01 o al menos una cadena ligera V según la SEQ ID NO: 02. En una realización más preferida, la parte de anticuerpo comprende al menos una cadena pesada V según la SEQ ID NO: 01 y al menos una cadena ligera V según la SEQ ID NO: 02. En una realización aún más preferida, la parte de anticuerpo comprende una cadena pesada V según la SEQ ID NO: 01 y una cadena  
30 ligera V según la SEQ ID NO: 02.

**[0033]** Se prefiere una parte de anticuerpo en la que las cadenas pesada y ligera están conectadas mediante un conector de anticuerpo.

**[0034]** El conector de anticuerpo puede comprender una secuencia según la SEQ ID NO: 03 o una secuencia que presenta al menos un 90% de identidad con la  
35 secuencia según la SEQ ID NO: 03. El conector de anticuerpo puede presentar una

secuencia según la SEQ ID NO: 03.

**[0035]** En una realización preferida, la parte de interleucina-2 es interleucina-2 humana o una variante funcional de la misma.

**[0036]** La parte de interleucina-2 puede comprender una secuencia según la SEQ ID NO: 04.

**[0037]** La parte de interleucina-2 puede estar glucosilada o no glucosilada. En el caso de la interleucina-2 no glucosilada, el patrón de glucosilación puede ser idéntico o diferente del de la interleucina-2 humana nativa.

**[0038]** Se prefiere el uso de una proteína de fusión en la que el conector de la proteína de fusión comprende una secuencia según la SEQ ID NO: 05; preferentemente, el conector de la proteína de fusión presenta una secuencia según la SEQ ID NO: 05.

**[0039]** Se prefiere que el conector de la proteína de fusión presente una longitud de 1 a 30 aminoácidos, con mayor preferencia de 4 a 25, con mayor preferencia aún de 6 a 20 aminoácidos.

**[0040]** En el caso de que la parte de anticuerpo presente un formato scFv o biespecífico, el conector de anticuerpo presenta una longitud de 1 a 20 aminoácidos, con mayor preferencia de 4 a 15, con mayor preferencia aún de 6 a 15 aminoácidos.

**[0041]** En una realización, se usa una composición según la invención como medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas.

**[0042]** La proteína de fusión puede estar presente en forma monomérica o multimérica, por ejemplo homodimérica, en solución acuosa, o mezclas de ellas.

**[0043]** El tratamiento anticanceroso de la presente invención consiste en una combinación de una proteína de fusión y gemcitabina, como se expone en la reivindicación 1. La combinación es especialmente útil para el tratamiento del cáncer.

**[0044]** En una realización preferida, la proteína de fusión presenta una parte de anticuerpo N-terminal y una parte de interleucina-2 C-terminal, o la proteína de fusión presenta una parte de interleucina-2 N-terminal y una parte de anticuerpo C-terminal.

**[0045]** En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende un conector que conecta la parte de anticuerpo y la parte de interleucina-2. Preferentemente, la parte de anticuerpo es humana, quimérica o humanizada, con especial preferencia humana.

**[0046]** En una realización preferida, la parte de anticuerpo que reconoce específicamente el dominio ED-B de la fibronectina se une con una afinidad sub-nanomolar. Para una revisión de las definiciones y mediciones de la afinidad

anticuerpo-antígeno, véase Ned y col. (1996). Trends in Biotechnol. 14, 465-470.

**[0047]** En una realización preferida, la parte de anticuerpo contiene al menos uno de los CDR del anticuerpo L19, preferentemente contiene todas las secuencias CDR del anticuerpo L19.

5 **[0048]** En una realización preferida, la parte de anticuerpo comprende al menos una de las SEQ ID NO: 6 a 11. Preferentemente, el anticuerpo comprende las secuencias según las SEQ ID NO: 6 a 11.

**[0049]** En otra realización preferida, la parte de anticuerpo comprende al menos una cadena pesada V según la SEQ ID NO: 01 o al menos una cadena ligera V según  
10 la SEQ ID NO: 02. En una realización más preferida, la parte de anticuerpo comprende al menos una cadena pesada V según la SEQ ID NO: 01 y al menos una cadena ligera V según la SEQ ID NO: 02. En una realización aún más preferida, la parte de anticuerpo comprende una cadena pesada V según la SEQ ID NO: 01 y una cadena ligera V según la SEQ ID NO: 02.

15 **[0050]** Se prefiere una parte de anticuerpo en la que las cadenas pesada y ligera están conectadas mediante un conector de anticuerpo.

**[0051]** El conector de anticuerpo puede comprender una secuencia según la SEQ ID NO: 03 o una secuencia que presenta al menos un 90% de identidad con la secuencia según la SEQ ID NO: 03. El conector de anticuerpo puede presentar una  
20 secuencia según la SEQ ID NO: 03.

**[0052]** La parte de interleucina-2 puede ser interleucina-2 humana o una variante funcional de la misma.

**[0053]** La parte de interleucina-2 puede comprender una secuencia según la SEQ ID NO: 04.

25 **[0054]** La parte de interleucina-2 puede estar glucosilada o no glucosilada. En el caso de la interleucina-2 no glucosilada, el patrón de glucosilación puede ser idéntico o diferente del de la interleucina-2 humana nativa.

**[0055]** Se prefiere el uso de una composición de la invención en la que la proteína de fusión presenta un conector y en la que el conector de la proteína de fusión  
30 comprende una secuencia según la SEQ ID NO: 05; preferentemente, el conector de la proteína de fusión presenta una secuencia según la SEQ ID NO: 05.

**[0056]** Se prefiere que el conector de la proteína de fusión presente una longitud de 1 a 30 aminoácidos, con mayor preferencia de 4 a 25, con mayor preferencia aún de 6 a 20 aminoácidos.

35 **[0057]** En el caso de que la parte de anticuerpo presente un formato scFv o

biespecífico, el conector de anticuerpo presenta una longitud de 1 a 20 aminoácidos, con mayor preferencia de 4 a 15, con mayor preferencia aún de 6 a 15 aminoácidos.

**[0058]** La presente invención es una combinación para el uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, como se expone en la reivindicación 1.

5 **[0059]** En una realización, la invención se refiere a una combinación según la invención en la que el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario y de mama, preferentemente cáncer de páncreas.

**[0060]** Se prefieren las combinaciones con sustancias adicionales usadas en el  
10 tratamiento del cáncer.

**[0061]** Una combinación es una composición farmacéutica que comprende al menos dos compuestos farmacéuticamente activos. Estos compuestos se pueden administrar simultáneamente o por separado a intervalos de 1 minuto a varios días. Los compuestos se pueden administrar por la misma vía o por diferentes; por ejemplo, es  
15 posible la administración oral de un compuesto activo y la administración parenteral del otro. Igualmente, los compuestos activos se pueden formular en un solo medicamento, por ejemplo en una solución para infusión, o como kit que comprende ambos compuestos formulados por separado. Asimismo es posible que ambos compuestos estén presentes en dos o más envases.

20 **[0062]** Una composición comprende al menos un compuesto farmacéuticamente activo junto con diluyentes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

**[0063]** La expresión “que reconoce específicamente” según la presente invención se refiere a que el anticuerpo se une a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ , y se  
25 une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad de unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. El antígeno es el dominio ED-B de la fibronectina.

**[0064]** El conector del anticuerpo es cualquier conector, preferentemente un  
30 conector peptídico, que sea adecuado para conectar los dominios Vh y Vl. En Bird y col., Science, 242, 423-426, 1988; Huston y col., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988, y en los documentos EP 0573551, EP 0623679 y EP 0318554, por ejemplo, documentos que se incorporan por referencia, se describen conectores adecuados.

**[0065]** Los conectores de la proteína de fusión son conectores adecuados para  
35 conectar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo y una segunda proteína

biológicamente activa, siendo el conector preferentemente peptídico. En los documentos EP 0573551, EP 0623679 y EP 0318554, documentos que se incorporan por referencia, se describen conectores adecuados. Concretamente se describen conectores adecuados en el documento EP 0623679.

- 5 **[0066]** La interleucina-2 según la presente invención es una interleucina-2 de mamífero, preferentemente la interleucina-2 humana y variantes funcionales de la misma. Las variantes funcionales de interleucina-2 son variantes de la interleucina-2 humana que conservan al menos un 10%, con mayor preferencia más del 50% y con mayor preferencia aún más del 90% de la actividad de la interleucina-2 humana nativa.
- 10 Las actividades de interleucina-2 son las actividades que presenta la interleucina-2 en ensayos bioquímicos o *in vivo*; en particular, la actividad de la interleucina-2 se puede medir por medio del efecto que ejerce sobre la proliferación y/o diferenciación de linfocitos T y B activados y de células asesinas naturales y/o sobre la inducción de la actividad de células T citotóxicas y/o de la actividad antitumoral de NK/ células
- 15 asesinas activadas por linfocinas (LAK) (Meazza R, Marciano S, Sforzini S y col. Analysis of IL-2 receptor expression and of the biological effects of IL-2 gene transfection in small-cell lung cancer. Br. J. Cancer. 1996; 74:788-795). En particular, las variantes funcionales son las muteínas de cisteína-125 de la interleucina-2 descritas en el documento EP 0109748, y otras muteínas que incluyen las muteínas de cisteína
- 20 descritas en el documento EP 136489, en particular serina 125-interleucina-2. Igualmente se puede alterar el extremo N-terminal de las variantes de hIL-2 sin influir significativamente en la actividad; en particular, se pueden deletar o alterar, preferentemente deletar, los aminoácidos 1 a 5 N-terminales, con especial preferencia la alanina N-terminal. Además, la interleucina-2 puede contener
- 25 modificaciones post-traduccionales alteradas o deletadas, en particular puede estar alterado o suprimido el patrón de glucosilación. La glucosilación se puede modificar o suprimir, por ejemplo, mutando la secuencia o expresando la proteína de fusión en un huésped apropiado. Por ejemplo, la aldesleukina, que está autorizada para el CCR metastásico, es des-alanil-1, serina-125 interleucina-2 humana no glucosilada
- 30 producida en *E. coli*.

- [0067]** “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “CCDA” se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos unidos a una célula
- 35 diana y seguidamente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para la

mediación de la CCDA, las células NK, solo expresan Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3, página 464, de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para valorar la actividad CCDA de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de CCDA *in vitro*, como el que se describe en la patente de EE.UU. n° 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). De forma alternativa o adicional, la actividad CCDA de la molécula de interés se puede valorar *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal como el que se describe en Clynes y col. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

**[0068]** Las “**células efectoras humanas**” son leucocitos que expresan uno o más FcR y desempeñan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos Fc $\gamma$ RIII y realizan la función efectora CCDA. Ejemplos de leucocitos humanos que median la CCDA incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, prefiriéndose las PBMC y las células NK.

**[0069]** Las expresiones “**receptor de Fc**” o “**FcR**” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Un FcR preferido es además uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) y que incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, incluidas las variantes alélicas y las formas resultantes del empalme alternativo de estos receptores. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen Fc $\gamma$ RIIA (un “receptor activador”) y Fc $\gamma$ RIIB (un “receptor inhibidor”), que presentan secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador Fc $\gamma$ RIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). El receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) (véase Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). El término “FcR” en la presente memoria abarca otros FcR, incluidos aquellos que se vayan a identificar en el futuro. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 11 7587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)).

[0070] La parte de anticuerpo comprende un anticuerpo como se define a continuación.

[0071] El término “**anticuerpo**” se usa en la presente memoria en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Preferentemente, el anticuerpo es humano, quimérico o humanizado, con especial preferencia humano.

[0072] Los “**fragmentos de anticuerpo**” comprenden una porción de un anticuerpo intacto que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen: fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla; dianticuerpos; minianticuerpos, nanoanticuerpos, anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpo. Preferentemente, el fragmento de anticuerpo es humano, quimérico o humanizado, con especial preferencia humano.

[0073] Los “**anticuerpos nativos**” son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada a través de un enlace disulfuro covalente, si bien el número de enlaces disulfuro varía en las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera presenta también puentes disulfuro intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos concretos forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

[0074] El término “**variable**” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente de un anticuerpo a otro en su secuencia y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto por su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos, denominados

regiones hipervariables, en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina  $\beta$  y están conectados mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina  $\beta$ . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen muy próximas entre sí mediante las FR y contribuyen, junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins Immunological Interest, 5ª ed., Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desempeñan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

15 [0075] La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados **fragmentos “Fab”**, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona el fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que presenta dos sitios de unión a antígeno y sigue siendo capaz de  
20 entrelazar antígeno.

[0076] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Esta región se compone de un dímero del dominio variable de una cadena pesada y de una cadena ligera unidos estrechamente de forma no covalente. Esta es la configuración en que las tres regiones  
25 hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Las seis regiones hipervariables confieren conjuntamente al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas de un antígeno) posee la capacidad de reconocer y  
30 unir el antígeno.

[0077] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluyen una o más  
35 cisteínas de la región de charnela del anticuerpo. En la presente memoria se designa

con Fab'-SH el Fab' en el que el (los) resto(s) de cisteína del dominio constante lleva(n) al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab') se producen originalmente como parejas de fragmentos Fab'<sub>2</sub> que presentan las cisteínas de charnela entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos  
5 de anticuerpo.

**[0078]** Las “**cadena ligeras**” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

10 **[0079]** Los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases en función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos se pueden subdividir en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las  
15 diferentes clases de anticuerpos se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas.

**[0080]** Los **fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena sencilla” o “scFv”** comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, estando estos dominios presentes en  
20 una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que le permita al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

25 **[0081]** En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos, generadas mediante el uso de las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando  
30 bibliotecas de fagos. En publicaciones posteriores se describe la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo mM) mediante intercambio de cadenas (Marks y col., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como por infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., Nuc. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)). Así,  
35 estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales del hibridoma

productor de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. También se puede modificar el ADN, por ejemplo sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas por las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. n° 4.816.567; 5 Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:685-691(1984)) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de inmunoglobulinas. Típicamente, tales polipéptidos distintos de inmunoglobulinas sustituyen a los dominios constantes de un anticuerpo, o sustituyen a los dominios variables de un sitio de combinación de 10 antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno con especificidad por un antígeno y un sitio de combinación de antígeno con especificidad por un antígeno diferente.

[0082] El término “**dianticuerpos**” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno. Tales fragmentos comprenden un 15 dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H-V_L$ ). Al usar un conector demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios están forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los 20 dianticuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en los documentos EP 0404097, WO 93/11161 y en Holliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5444-5448 (1993).

[0083] La expresión “**anticuerpo monoclonal**” como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos 25 sustancialmente homogéneos, es decir que los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos salvo por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos al estar dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que en las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, que típicamente 30 incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que son sintetizados por el cultivo de hibridomas sin estar contaminados con otras 35 inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” hace referencia al carácter del anticuerpo, indicando que se obtiene a partir de una población sustancialmente

homogénea de anticuerpos, y no ha de interpretarse como que la producción del anticuerpo deba realizarse mediante un procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se han de usar según la presente invención se pueden producir mediante el procedimiento del hibridoma, descrito por primera vez por  
5 Kohler y col., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden producir mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo la patente de EE.UU. n° 4.816.567).

[0084] Los “**anticuerpos monoclonales**” también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos producidos en fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol.,  
10 222581-597 (1991).

[0085] Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente **anticuerpos “quiméricos”** (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos procedentes de una especie concreta o que pertenecen  
15 a una clase o subclase de anticuerpos concreta, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n° 4.816.567; Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,  
20 81: 6851-6855 (1984)).

[0086] Los anticuerpos quiméricos de interés para la presente memoria incluyen **anticuerpos “primatizados”**, que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable procedentes de un primate no humano (por ejemplo los monos del Viejo Mundo, tales como babuinos, macacos rhesus o macacos cangrejeros) y  
25 secuencias de la región constante humana (patente de EE.UU. n° 5.693.780).

[0087] **Anticuerpos humanizados:** En la técnica se han descrito procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado presenta, introducidos en él, uno o más restos de aminoácidos procedentes de una fuente no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con  
30 frecuencia restos “importados”, que típicamente provienen de un dominio variable “importado”. La humanización se puede efectuar esencialmente según el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239: 1534-1536 (1988)), en el que secuencias de la región hipervariable sustituyen a las  
35 secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales

anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.826.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha 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 la región hipervariable y posiblemente algunos restos FR están sustituidos por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedores. La elección de dominios variables humanos tanto ligeros como pesados para la producción de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el denominado procedimiento del mejor ajuste, la biblioteca completa de secuencias conocidas del dominio variable humano es explorada con la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor. La secuencia humana más próxima a la del roedor se acepta después como región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y col., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). En otro procedimiento se usa una región marco concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta y col., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)). Asimismo es importante que los anticuerpos se humanicen reteniendo la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, los anticuerpos humanizados se preparan, según un procedimiento preferido, mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y de diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de las inmunoglobulinas son usuales y conocidos para los expertos en la técnica. Existen programas informáticos que ilustran y visualizan las estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina seleccionadas como candidatos.

**[0088]** La inspección de estas representaciones permite analizar el papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, analizar los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma se pueden seleccionar y combinar restos FR del receptor e importar las secuencias de manera que se obtenga la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los restos de la región hipervariable influyen directa y sustancialmente en la unión al antígeno.

**[0089] Anticuerpos humanos:** Como alternativa a la humanización se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible ahora generar animales transgénicos (por ejemplo ratones) que, tras la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin producir inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal provoca la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina humana de línea germinal a tales ratones mutantes en la línea germinal iniciará la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993); y las patentes de EE.UU. nº 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

**[0090]** De forma alternativa, se puede usar la **tecnología de exposición en fagos** (McCafferty y col., Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro* a partir de los repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulinas procedentes de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes de los dominios V del anticuerpo se clonan en marco en un gen de una proteína mayoritaria o minoritaria de la cubierta de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Puesto que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de hebra sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La exposición en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión, véase Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Para la exposición en fagos se pueden usar varias fuentes de segmentos génicos V. Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V procedentes de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y aislar anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluidos los autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) o Griffith y col., EMBO J., 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y

5.573.905. También se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. n° 5.567.610 y 5.229.275).

**[0091]** Cuando se usa en la presente memoria, la expresión “**región hipervariable**” se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo los restos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) y 89 a 97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31 a 35 (H1), 50 a 56 (H2) y 95 a 102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo los restos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) y 91 a 96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) y 96 a 101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los restos “marco” o “FR” son aquellos restos del dominio variable que no son los restos de la región hipervariable como se definen en la presente memoria.

**[0092] Fragmentos de anticuerpo:** Se han desarrollado diversas técnicas para producir fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos provenían de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos ahora directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos antes comentadas. De forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col., *Biotechnology* 10: 163-167 (1992)). Según otro abordaje, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. El experto en la técnica apreciará otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. En otra realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véanse el documento WO 93/16185, la patente de EE.UU. n° 5.571.894 y la patente de EE.UU. n° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un “anticuerpo lineal”, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

**[0093]** La expresión “**que reconoce específicamente**” se refiere a cualquier

anticuerpo que se une a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos  $1 \times 10^{-7}$  M, y se une al dominio ED-B de la fibronectina con una afinidad que es al menos dos veces mayor que la de unión a un antígeno inespecífico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del dominio ED-B de la fibronectina.

5 **[0094]** Se contemplan la(s) **modificación(es) de la secuencia de aminoácidos de antagonistas proteicos o peptídicos o de parte del anticuerpo** descritas en la presente memoria. Por ejemplo, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del antagonista. Las variantes en la secuencia de aminoácidos del antagonista se preparan introduciendo cambios nucleotídicos  
10 apropiados en el ácido nucleico del antagonista o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del antagonista. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se efectúa con el fin de obtener el constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Por lo tanto, en el  
15 caso de la cadena pesada o ligera se pueden variar los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20. En el caso de la interleucina-2 se pueden variar los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ó 33. En el caso del conector se pueden variar los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7. En el caso del conector las variaciones son  
20 mucho más flexibles, ya que éste está presente simplemente para crear un espacio suficiente entre las secuencias de aminoácidos funcionales. Una variación se define como una deleción, inserción y/o sustitución.

**[0095]** Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos post-traduccionales del antagonista, como cambiar el número o la posición de los sitios de  
25 glucosilación. Un procedimiento útil para identificar ciertos restos o regiones del antagonista que son lugares preferidos para la mutagénesis se denomina “mutagénesis por barrido de alanina”, como se describe en Cunningham y Welk, Science, 244: 1081-1085 (1989). En este caso, se identifica un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo restos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) que se reemplazan por  
30 un aminoácido de carga neutra o negativa (con especial preferencia alanina o polialanina) para intervenir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas posiciones de aminoácidos que demuestren una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes de la secuencia de aminoácidos en los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio  
35 para la introducción de una variación en la secuencia de aminoácidos está

predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se efectúa una mutagénesis por barrido de alanina o aleatoria en el codón o la región diana, y las variantes del antagonista expresadas se seleccionan respecto a la actividad deseada.

5 Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino- y/o carboxilo-terminales cuya longitud oscila entre un resto y polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuenciales de uno o múltiples restos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un antagonista con un resto de metionilo N-terminal o el antagonista fusionado con un polipéptido

10 citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula antagonista incluyen la fusión del extremo N- o C-terminal del antagonista con una enzima o con un polipéptido que aumente la semivida del antagonista en suero. Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes presentan al menos un resto de aminoácido de la molécula antagonista sustituido por un resto diferente. Los sitios de los

15 antagonistas de anticuerpo de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, aunque también se contemplan alteraciones en la FR. En la columna titulada “sustituciones preferidas” de la tabla 1 se muestran sustituciones conservadoras.

[0096]

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu, Asn	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn, Glu	Asn
Glu	Asp, Gln	Asp
Gly	Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu	norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

[0097] Si estas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados “sustituciones ejemplares” en la tabla 1, o como se describe adicionalmente más adelante en relación con las clases de aminoácidos, y seleccionar los productos.

[0098] Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del antagonista seleccionando las sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución en una conformación, por ejemplo, laminar o helicoidal, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) la masa de la cadena lateral. Los restos presentes en la naturaleza se dividen en grupos en función de las propiedades comunes de la

cadena lateral:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) neutros hidrófilos: Cys, Ser, Thr;

(3) ácidos: Asp, Glu;

5 (4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

**[0099]** Las sustituciones no conservadoras suponen reemplazar un miembro de una de estas clases por uno de otra clase. También se puede sustituir cualquier resto de  
10 cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del antagonista, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar un entrecruzamiento aberrante. A la inversa, se pueden añadir al antagonista enlace(s) de cisteína para mejorar su estabilidad (en particular cuando el antagonista es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

15 **[00100]** Un tipo de variante de sustitución especialmente preferido implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental. En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para ser desarrolladas posteriormente presentarán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental a partir del cual hayan sido generadas. Una forma conveniente de  
20 generar tales variantes de sustitución consiste en la maduración de la afinidad usando la expresión en fagos. En resumen, se mutan varios sitios (por ejemplo 6 ó 7 sitios) de la región hipervariable para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo así generadas se expresan de manera monovalente en partículas de fago filamentosas en forma de fusiones con el producto  
25 del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. Después, las variantes expresadas en los fagos se seleccionan en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se describe en la presente memoria. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación se puede realizar una mutagénesis por barrido de alanina para identificar los restos de la región hipervariable  
30 que contribuyan significativamente a la unión al antígeno. De forma alternativa o adicional, puede resultar conveniente analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y los restos adyacentes son candidatos para una sustitución según las técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez generadas  
35 tales variantes, el panel de variantes se somete a una exploración como se describe en

la presente memoria, y los anticuerpos que muestren propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para el desarrollo posterior.

**[0100]** Otro tipo de variante de aminoácidos del antagonista altera el patrón de glicosilación original del antagonista. Por alteración se entiende la deleción de uno o 5 más restos carbohidrato presentes en el antagonista y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el antagonista.

**[0101]** La glicosilación de polipéptidos típicamente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N significa que el resto carbohidrato está asociado a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X- 10 treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la asociación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un 15 hidroxiaminoácido, habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

**[0102]** La adición de sitios de glicosilación al antagonista se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas antes descritas (para los sitios de N-glicosilación). 20 La alteración también se puede llevar a cabo mediante la adición de o la sustitución por uno o más restos de serina o treonina a o en la secuencia del antagonista original (para los sitios de O-glicosilación).

**[0103]** Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del antagonista se preparan mediante una gran variedad de 25 procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos presentes en la naturaleza) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante preparada con anterioridad o de una versión no variante del 30 antagonista.

**[0104]** Puede resultar deseable modificar el antagonista respecto a su función efectora, por ejemplo de manera que aumente la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (CCDA) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del antagonista. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de 35 aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo antagonista. De forma alternativa o

adicional, se pueden introducir resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede presentar una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor capacidad de destrucción celular mediada por el complemento y 5 citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). Véanse Caron y col., J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con una actividad antitumoral incrementada usando agentes reticulantes heterobifuncionales, como se describe en Wolff y col. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). De forma alternativa, se puede 10 construir un anticuerpo que presente dos regiones Fc y que, por lo tanto, pueda presentar mayores capacidades de lisis por complemento y CCDA. Véase Stevenson y col. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

**[0105]** Se puede usar L19IL2 que comprende las secuencias según la SEQ ID NO: 4.

15 **[0106]** Se puede usar L19IL2 que comprende las secuencias según las SEQ ID NO: 6 a 11.

**[0107]** Se puede usar L19IL2 que comprende las secuencias según las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5.

**[0108]** La proteína de fusión L19IL2 puede contener variaciones respecto a las 20 secuencias según las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5. Las variaciones de la proteína de fusión L19IL2 vienen definidas por las variaciones mencionadas anteriormente. En particular, los aminoácidos de la molécula L19IL2 se pueden modificar respecto a los definidos por las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5 por delección, inserción y/o sustitución de aminoácidos según la tabla 2:

25

Tabla 2

SEQ ID NO:	Tipo	Número de aminoácidos que se pueden deleccionar, insertar y/o sustituir en comparación con las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 y 5
SEQ ID NO: 1	VH	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
SEQ ID NO: 2	VL	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
SEQ ID NO: 3	conector mAb	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
SEQ ID NO: 4	IL-2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,

		30
SEQ ID NO: 5	Conector proteína de fusión	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

**[0109]** En Pini y col. (1998) J. Biol. Chem., vol. 273, páginas 21769-21776, y en los documentos WO 02/20563, WO 2005/37312 y WO 99/58570 se mencionan modificaciones adicionales.

**Uso como medicamento adecuado para la intervención terapéutica**

5 **[0110]** La combinación de la invención presenta actividad farmacológica. En particular, la combinación muestra actividad farmacológica en numerosos estados patológicos o de enfermedad relacionados con cáncer, en especial con cáncer de páncreas.

10 **[0111]** La combinación de la invención está indicada, por lo tanto, para el uso en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, de ovario y de mama, en especial del cáncer de páncreas. La proteína de fusión y la gemcitabina se pueden administrar simultáneamente o por separado en momentos diferentes.

15 **[0112]** Para el tratamiento de tales estados la dosis apropiada naturalmente variará dependiendo, por ejemplo, del huésped, del modo de administración y de la naturaleza y gravedad del estado que se ha de tratar.

20 **[0113]** En general, una dosis repetida de la proteína de fusión L19IL2 indicada en los seres humanos se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1 a 100 millones de UI equivalentes de IL-2 como dosis fija, preferentemente de 5 a 30 millones de UI equivalentes de IL-2 como dosis fija por administración. El anticuerpo debe administrarse en una dosis no tóxica para el órgano más sensible del cuerpo (órgano limitante de dosis). Para los anticuerpos, el riñón puede ser el órgano limitante de dosis, y el impacto sobre el sistema cardiovascular puede ser limitante de dosis para L19IL2.

25 **[0114]** Los miembros de unión específicos, que incluyen los que comprenden el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, se pueden administrar a un paciente que necesite el tratamiento por cualquier vía adecuada, normalmente por infusión en el torrente sanguíneo y/o directamente en el lugar que se ha de tratar, por ejemplo el tumor. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, de la vía de tratamiento, del  
30 tamaño y la localización del área que se ha de tratar (por ejemplo el tumor), de la naturaleza exacta del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo entero, molécula scFv) y de

la naturaleza de cualquier marca u otra molécula detectable unida al anticuerpo. Los tratamientos se pueden repetir a discreción del médico a intervalos diarios, bisemanales, semanales o mensuales.

**[0115]** La dosis de gemcitabina administrada variará en función del modo de uso y de la vía de uso, así como de las necesidades del paciente. En general, se prefiere una administración semanal en lugar de una posología diaria para un tratamiento sistémico de pacientes adultos. Para la pauta semanal aplicada con más frecuencia, la dosis convencional de gemcitabina es de 1.000 a 1.250 mg/m<sup>2</sup> en forma de infusión intravenosa durante 15 a 30 minutos.

10 **[0116]** La invención se refiere a:

(a) el uso de L19IL2 o de su combinación con gemcitabina para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en especial del cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, de ovario y de mama, en particular del cáncer de páncreas;

15 (b) un procedimiento de tratamiento del cáncer, en especial del cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, de ovario y de mama, en particular del cáncer de páncreas,

comprendiendo este procedimiento la administración de una composición farmacéutica de L19IL2 en combinación con gemcitabina, en el que la cantidad de combinación  
20 suprime la enfermedad y en el que la composición farmacéutica de la combinación se administra a un paciente que la necesite;

(c) una composición farmacéutica que comprende L19IL2 y gemcitabina.

**[0117]** El procedimiento de administración preferido es por vía parenteral, en particular por infusión intravenosa.

25 **EJEMPLOS:**

**[0118]** La IL-2 es una de las citocinas antitumorales más potentes que se conocen. Sin embargo, la eficacia de la IL-2 administrada de forma sistémica se ha visto mermada por las toxicidades concomitantes (Bubenik J, Den Otter W, Huland E. Local cytokine therapy of cancer: interleukin-2, interferons and related cytokines. Cancer  
30 Immunol Immunother 2000; 49:116-122; Baluna R, Rizo J, Gordon BE, Ghetie V, Vitetta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:3957-3962). En consecuencia, los potenciales esfuerzos se han dirigido al desarrollo de protocolos de tratamiento locorregional con IL-2.  
35 Recientemente, el tratamiento local con IL-2 de pacientes con cáncer de páncreas

avanzado a través de catéteres arteriales o en la vena porta en combinación con poliquimioterapia ha mostrado resultados alentadores, proporcionando un aumento en las tasas de respuesta, una reducción de la masa tumoral y una prolongación del tiempo de supervivencia (Abdel-Wahab M, El Shennawy F, Agha S, Ragab E, Fathi O, Sultan A, Elghawalby N, Ezzat F. Evaluation of cell mediated immunity in advanced pancreatic carcinoma before and after treatment with interleukin-2 (IL-2). Hepatogastroenterology 1999; 46, supl. 1:1293-1296; Lygidakis NJ, Vlachos L, Raptis S, Sgourakis G, Mourikis D, Kehagias D. Consecutive re-explorations for final resection of initially unresectable pancreatic head carcinoma. Hepatogastroenterology 1999; 46:2229-2239). En este contexto, el suministro selectivo de IL-2 basado en anticuerpos para el cáncer de páncreas constituye un planteamiento atractivo, pues con él se lograría el propósito de acumular IL-2 específicamente en el tumor, controlando igualmente los tumores primarios y diseminados y limitando al mismo tiempo la toxicidad sistémica. En este estudio los inventores investigaron la eficacia terapéutica de la proteína de fusión recombinante L19IL2 en el cáncer de páncreas.

### **Materiales y métodos**

#### **Materiales**

[0119] Se adquirió lo siguiente: las líneas celulares de carcinoma de páncreas humano MiaPaca (Colección Americana de Cultivos Tipo) y DanG y la línea celular de linfoma murino YAC-1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig, Alemania); medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio RPMI 1640, PBS, solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), solución antibiótica/ antimicótica, glutamina e higromicina B (Invitrogen, Berlín, Alemania); suero bovino fetal (FCS), tripsina/EDTA, penicilina y estreptomina (Biochrom, Berlín, Alemania); proteína de fusión humana L19IL2 y fragmento de anticuerpo scFv homodimérico humano L19 (Schering AG, Berlín, Alemania); Ficoll-Paque Plus (Amersham, Braunschweig, Alemania); colagenasa tipo 3 (Worthington, NJ, EE.UU.); ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, CA, EE.UU.); mezcla de nucleótidos para PCR (Roche Diagnostics, Indianápolis, EE.UU.); kit de detección de apoptosis tumoral *in situ* TACS (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania); anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra pancitoqueratina humana (C11) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.); anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra Ki67 humana (Dianova, Hamburgo, Alemania); anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra NK 1.1 de ratón conjugado a biotina (PK136) (Serotec, Dusseldorf, Alemania), anticuerpo monoclonal de rata dirigido

contra CD11b de ratón (M1/70) y anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra CD49b de ratón conjugado a R-PE (DX5) (BDBiosciences, Heidelberg, Alemania); antisuero de conejo dirigido contra asialo-GM1 (ASGM1) (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemania); anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CD31 humano (JC/70A), anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra CA 19-9 humano (1116-NS-19-9) y sustrato/cromógeno AEC (Dako, Hamburgo, Alemania); kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Wertheim-Bettingen, Alemania); azul Alamar (BioSource, CA, EE.UU.); QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania); gemcitabina (Lilly, Gießen, Alemania), Rompun 2% (Bayer GmbH, Leverkusen, Alemania); Ketavet (Pharmacia GmbH, Erlangen, Alemania). Todos los demás agentes químicos y reactivos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (Deisenhofen, Alemania).

#### **Muestras de tejido humano**

[0120] Se obtuvieron 21 muestras de tejido de carcinoma de páncreas, 17 de pancreatitis crónica y 13 de páncreas normal de individuos sometidos a una resección quirúrgica en el Departamento de Cirugía del Charité University Hospital. Este estudio fue aprobado por el comité ético local, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito antes de la cirugía.

#### **Cultivo celular**

[0121] Las líneas celulares de carcinoma de páncreas humano DAN-G y MiaPaca y la línea celular de linfoma murino YAC-1 se cultivaron como se ha descrito previamente (Wagner K, Scholz A, Wiedenmann Bertram y Menrad Andreas. The targeted immunocytokine L19IL2 efficiently inhibits the growth of orthotopic cancer in nude mice. Artículo enviado a Cancer Research). Las células MiaPaca transfectadas de forma estable con un constructo de ADN de angiopoyetina-2 se mantuvieron como células MioPaca de tipo silvestre salvo por la adición de higromicina B a una concentración de 300 µg/ml.

#### **Animales**

[0122] Se adquirieron ratones sin pelo NMRI hembra (edad aproximada 10 semanas; peso 21-25 g) de Bomholtgard (Ry, Dinamarca). El cuidado de los animales se rigió por las directrices institucionales y todos los experimentos fueron aprobados por las autoridades locales de investigación con animales.

#### **Implante tumoral y tratamiento *in vivo***

[0123] Se establecieron tres modelos murinos de xenoinjerto ortotópico de carcinoma de páncreas, que incluían dos modelos no metastásicos obtenidos por inyección de células de tipo silvestre de las líneas celulares de carcinoma de páncreas

humano DanG y MiaPaca y un modelo metastásico obtenido por implante de células MiaPaca transfectadas de forma estable con un constructo de ADN de angiopoyetina-2 (MiaPaca-A2) (establecidas por A. Scholz, datos no publicados). El trasplante ortotópico se realizó como se ha descrito (Alves F, Contag S, Missbach M, Kaspereit J, 5 Nebendahl K, Borchers U, Heidrick B, Streich R, Hiddemann W. An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of de metastatic cascade. *Pancreas* 2001; 23:227-235). En resumen, los ratones se anestesiaron por administración intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Tras la laparotomía media se 10 abrió el peritoneo y se expuso el páncreas. Con una jeringuilla para insulina se inyectaron alícuotas de  $1 \times 10^6$  células tumorales en un volumen de 10  $\mu$ l de PBS en la cabeza del páncreas para infiltrar visiblemente el tejido pancreático. El páncreas se volvió a colocar en su posición original y la pared abdominal se cerró en dos capas usando Vicryl 6-0 para el peritoneo y grapas para sutura para la piel. Antes de iniciar el 15 tratamiento se sacrificaron 10 ratones para confirmar la presencia de lesiones tumorales. Los ratones se aleatorizaron y grupos de 10 a 12 ratones se trataron por vía intravenosa (i.v.) con vehículo (solución salina al 0,9%), IL-2 no dirigida, scFv homodimérico L19 o L19IL-2, formado por IL-2 conjugada al scFv homodimérico L19, o por vía i.p. junto con gemcitabina según diferentes protocolos descritos en la 20 sección de resultados. Todos los agentes terapéuticos se diluyeron en solución salina al 0,9% y se administraron en un volumen de 1  $\mu$ l/PC. Una vez finalizado el tratamiento, los ratones se sacrificaron, se recogieron muestras de sangre y se calculó el volumen tumoral usando la fórmula longitud x anchura x profundidad x  $\pi/6$ . El área de los nódulos linfáticos en el modelo del tumor metastásico MiaPaca-A2 se calculó 25 determinando el diámetro más grande y su diámetro perpendicular y calculando el producto de las dos mediciones. En un experimento, los ratones se mantuvieron vivos después de completar el tratamiento para obtener datos a largo plazo. Al final del tratamiento y, después, bisemanalmente se extrajeron muestras de sangre de los ratones por sangrado retroorbital con capilares de recogida de sangre heparinizados para 30 ensayar los niveles de CA 19-9 en suero. El tiempo de supervivencia de los ratones se siguió hasta el día 100 después de finalizar el tratamiento (día 121 después del trasplante de células tumorales). Los ratones se consideraron curados si el día 100 no presentaban un tumor detectable.

#### **Depleción de células asesinas naturales (NK)**

35 [0124] La reducción de células NK se realizó como se ha descrito anteriormente

(Peron JM, Couderc B, Rochaix P, Douin-Echinard V, Asnacios A, Souque A, Voigt JJ, Buscail L, Vinel JP, Favre G. Treatment of murine hepatocellular carcinoma using genetically modified cells to express interleukin-12. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19:388-396). En resumen, se inyectó a los ratones por vía i.p. 50 µl de anticuerpo dirigido contra asialo-GM-1 (ASGM1) tres días antes de la inyección de células tumorales y cada cuatro días, hasta un total de seis inyecciones. La calidad de la reducción de células NK se siguió por citometría de flujo y ensayos de citotoxicidad.

#### **Preparación de células mononucleares (MNC) de bazo**

**[0125]** Las células mononucleares se prepararon a partir de los bazos de ratones carentes o no de células NK como se ha descrito en otro lugar. En resumen, el bazo se extirpó bajo anestesia general profunda y se digirió con colagenasa durante 1 hora a 37°C. Seguidamente, el contenido se pasó a través de un filtro de células de 100 µm y se lavó dos veces con HBSS. Las células mononucleares se separaron de la suspensión de células por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque.

#### **15 Ensayo de citotoxicidad con azul Alamar**

**[0126]** La actividad citotóxica de las MNC aisladas de bazo murino frente a células YAC-1 se examinó usando un ensayo de citotoxicidad con azul Alamar de 24 horas, como se ha detallado previamente.<sup>22</sup>

#### **Citometría de flujo**

**[0127]** Se incubaron durante 15 min a 4°C  $1 \times 10^6$  MNC de bazo aisladas de ratones carentes o no de células NK con 1 µg de anticuerpo dirigido contra NK 1.1 marcado con PE. Tras lavarlas con PBS se analizó la presencia de células fluorescentes por FACScan usando el software Cellquest (Becton Dickensen; Heidelberg, Alemania).

#### **25 Análisis inmunohistoquímico**

**[0128]** Las muestras de tejido humano y murino extirpado quirúrgicamente se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y, tras fijarlas durante 20 minutos en PFA al 4%, pH 7, se analizaron en ensayos inmunohistoquímicos secciones de criostato de 4 µm del tejido congelado usando la técnica de avidina/ biotina descrita previamente. Los portaobjetos se incubaron durante 1 hora con los siguientes anticuerpos primarios: L19IL2 biotinilado (30 µg/ml), monoclonal de ratón dirigido contra CD31 humano diluido 1:100, de rata dirigido contra CD11b de ratón diluido 1:50, biotinilado de ratón dirigido contra CD161b/c/NK1.1 de ratón diluido 1:50, biotinilado de ratón dirigido contra pancitoqueratina humana diluido 1:50. Como control negativo se usaron secciones teñidas con PBS en lugar de con el anticuerpo

primario. Las células proliferativas se detectaron con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra Ki67 humano usando el Animal Research Kit. Las células apoptóticas se detectaron mediante el ensayo de marcación de cortes terminales con dUTP mediada por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) usando el kit de  
5 detección de apoptosis *in situ* TumorTacs. Ambos procedimientos se realizaron conforme a las instrucciones del fabricante, salvo por que se usó 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) como sustrato/ cromógeno. Se incluyeron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario (Animal Research Kit) o la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL). El análisis inmunohistoquímico cuantitativo para el  
10 área de tejido tumoral vital (no necrótico) se realizó por análisis de imágenes asistida por ordenador usando el software Axiovision 4.2 (Zeiss, Jena, Alemania). Para la cuantificación de células proliferativas, apoptóticas e inflamatorias se analizaron 20 áreas de medición (680 x 510  $\mu\text{m}$ , 20 aumentos) seleccionadas al azar de cada tipo de tumor, y para la evaluación de la expresión de ED-B FN se exploraron 10 áreas (1.390  
15 x 1.000  $\mu\text{m}$ , 10 aumentos). Los resultados representan la tinción positiva en porcentaje del área de medición (células inflamatorias, ED-B FN) o la relación de células tumorales positivas en porcentaje de las células tumorales totales (Ki67, TUNEL), respectivamente. Para el análisis cuantitativo del área tumoral necrótica se exploraron secciones H&E a baja potencia (x 2,5). Las áreas tumorales total y necrótica se  
20 marcaron en la pantalla y las áreas se calcularon mediante el sistema de análisis de imágenes, expresándose la relación entre el área tumoral necrótica y el área tumoral total en porcentaje.

#### **Extracción de ADN y reacción en cadena de la ADN-polimerasa (PCR)**

[0129] El ADN genómico de los nódulos linfáticos de ratón se extrajo con el  
25 QIAamp DNA Mini Kit siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La presencia de ADN humano específico se comprobó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando un fragmento de 850 pb de la región  $\alpha$ -satélite del cromosoma 17 humano y usando el cebador directo 5'-gggataatttcagctgactaacacg-3' y el cebador inverso 5'-ttccgttagttaggtgcagttatc-3' según el protocolo descrito por  
30 Becker y col. (Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, Fichtner I. Sensitive PCR method for the detection and real time quantification of human cells in xenotransplantation systems. Br J Cancer 2002; 87:1328-1335).

#### **Parámetros séricos**

[0130] Las muestras de sangre de ratón se obtuvieron por sangrado retroorbital o  
35 decapitación. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron a -

20°C. Los niveles de CA 19-9 en suero se midieron mediante un inmunoensayo quimioluminiscente completamente automatizado en un ADVIA Centaur (Bayer, Leverkusen, Alemania) y los niveles de lipasa se determinaron usando un ensayo colorimétrico cinético en un sistema ADVIA 2400 (Bayer, Leverkusen, Alemania).

## 5 Análisis estadístico

[0131] Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney bilateral y la prueba exacta de Fisher, y la correlación se valoró por regresión lineal usando el software estadístico GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .

## 10 Resultados

### **ED-B FN está expresado en exceso selectivamente en el carcinoma de páncreas humano**

[0132] Para evaluar el papel postulado de ED-B FN como diana adecuada para suministrar selectivamente IL-2 al cáncer de páncreas, los inventores estudiaron inicialmente el patrón de expresión de ED-B FN en tejido pancreático humano no transformado, en la pancreatitis crónica y en el adenocarcinoma ductal. En paralelo se tiñeron secciones seriadas de los mismos tejidos con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno específico de células endoteliales CD31. Todas las muestras de carcinoma analizadas, excepto una ( $n = 19$ ), revelaron una acumulación de ED-B FN en el lado abluminal de los vasos sanguíneos tumorales y en el estroma tumoral. La cuantificación de la expresión de ED-B FN en el cáncer de páncreas reveló un nivel medio de ED-B FN de  $7,35\% \pm 1,60\%$  (fig. 1B). Por el contrario, los vasos sanguíneos y el estroma de tejidos pancreáticos no transformados ( $n = 11$ ) y de pancreatitis crónica ( $n = 15$ ) mostraron una expresión de ED-B FN despreciable o nula, correspondiente a una relación de ED-B FN inferior a  $0,1\%$ , respectivamente (fig. 1B). Así, estos datos confirman la sobreexpresión selectiva de ED-B FN en el carcinoma de páncreas, sentando de este modo las bases para una terapia dirigida, basada en ED-B FN, para el cáncer de páncreas.

[0133] Para estudiar la eficacia terapéutica de L19IL2 en el cáncer de páncreas, los inventores trataron de establecer un modelo de ratón adecuado e inyectaron ortotópicamente las líneas celulares de carcinoma de páncreas humano DanG y MiaPaca en el páncreas de ratones sin pelo. El análisis inmunohistoquímico del patrón de expresión de ED-B FN en los tumores de páncreas ortotópicos resultantes reveló sistemáticamente una inmunotinción intensa alrededor de los vasos sanguíneos tumorales y en el compartimento estromal. En comparación con la situación humana,

el nivel cuantitativo de ED-B FN era significativamente mayor en los tumores DanG (22,33%  $\pm$  0,65%) pero, en cambio, similar en los tumores MiaPaca (7,96%  $\pm$  1,32%) (fig. 1B). La verificación de la expresión cualitativa y cuantitativa de ED-B FN mimetizó la situación humana *in vivo* y permitió evaluar el impacto terapéutico de L19IL2 en el carcinoma de páncreas.

### **L19IL2 ejerce una actividad antitumoral significativa frente al cáncer de páncreas establecido**

**[0134]** Para determinar la eficacia del tratamiento con L19IL2 en una situación de cáncer de páncreas se inyectó ortotópicamente la línea celular de cáncer de páncreas humano DanG en ratones atímicos sin pelo. Tras el establecimiento de tumores sólidos los ratones se aleatorizaron para recibir solución salina al 0,9% o 1,43 MUI/kg PC o 4,29 MUI/kg PC de equivalentes de IL-2 de L19IL2 o IL-2 no dirigida durante 10 días. Al final del tratamiento se sacrificaron todos los ratones y se calculó el volumen tumoral. Mientras que el tratamiento con IL-2 no presentaba ningún efecto en el crecimiento del tumor a la dosis más baja y sólo un efecto reducido a la concentración más alta, la administración de L19IL2 provocó una reducción estadísticamente significativa en el volumen tumoral al 21,4% (1,43 MUI/kg de PC) y 2,7% (4,29 MUI/kg de PC) del observado en los ratones control, siendo de este modo significativamente superior a la IL-2 no dirigida (fig. 2A, panel izquierdo). En un experimento separado los inventores trataron de excluir la actividad antitumoral independiente de IL-2 del fragmento de anticuerpo scFv L19 propiamente dicho. Con este propósito se trataron ratones durante 10 días con 4,29 MUI/kg PC de L19IL2 o con cantidades equimolares de scFv L19 solo. Según el primer experimento, la administración de L19IL2 condujo de forma reproducible a una disminución estadísticamente significativa de la masa tumoral en comparación con los ratones control. Por el contrario, scFv L19 no logró ningún efecto inhibitor del crecimiento, lo que recalca el papel de la IL-2 como resto efector terapéuticamente activo (fig. 2A, panel derecho). Puesto que la evaluación continua del tamaño tumoral por mediciones del calibre no es fiable para tumores inyectados ortotópicamente, los inventores se propusieron establecer un marcador sérico adecuado para seguir el progreso del tumor, así como los efectos terapéuticos sobre el crecimiento tumoral, y fueron capaces de demostrar una correlación significativa entre el volumen tumoral y las concentraciones de CA 19-9 en suero (n = 56; p < 0,0001) (fig. 2B, panel izquierdo). Por consiguiente, y en concordancia con la reducción inducida por L19IL2 de la masa tumoral antes descrita, la administración de L19IL2 provocó una disminución significativa de los

niveles de CA 19-9 en suero en los ratones con tumores, mientras que la IL-2 no afectó a los marcadores tumorales en suero (datos no mostrados). En base a esta observación, los inventores evaluaron la relación tiempo/ respuesta del retraso en el crecimiento tumoral inducido por L19IL2 recogiendo repetidamente muestras de sangre de los 5 ratones tratados con vehículo y con L19IL2. Curiosamente, ya tres días después de comenzar con el tratamiento se observó un retraso en el crecimiento tumoral dependiente de L19IL2 a razón de unos niveles de CA 19-9 en suero dos veces menores que en los controles, y esta diferencia continuó aumentando hasta el final del experimento. De hecho, en este momento se pudo detectar un incremento de más de 10 quince veces en los niveles de CA 19-9 en suero en el grupo control, mientras que los marcadores tumorales en suero de ratones que recibieron L19IL2 no diferían significativamente del valor inicial al comienzo del tratamiento (fig. 2B, panel derecho). Una vez demostrado el efecto terapéutico de L19IL2, los inventores trataron a continuación de asegurarse de que la actividad de IL-2 y la respuesta inflamatoria 15 siguiente está restringida al tumor y no provoca una pancreatitis aguda en el tejido pancreático adyacente no transformado. Con este propósito, se estudiaron en los ratones tratados con solución salina o con IL-2 dirigida o no dirigida los niveles de lipasa en suero como marcador sustituto de pancreatitis. Sin embargo, en comparación con los controles, ni L19IL2 ni la IL-2 no dirigida interfirieron con las concentraciones 20 de lipasa en suero (fig. 2C). Este hallazgo se vio confirmado adicionalmente por el análisis histológico de los tumores de páncreas y del resto de los tejidos pancreáticos no transformados de animales tratados con L19IL2, usando la tinción HE convencional y la inmunotinción con anticuerpos dirigidos contra NK 1.1 (células asesinas naturales (NK)) y CD11b (predominantemente macrófagos), respectivamente. Cabe señalar que 25 no se pudieron detectar señales de pancreatitis aguda y que las células inflamatorias se acumulaban selectivamente en el tumor, excluyendo el tejido pancreático adyacente no transformado, lo que descarta la pancreatitis como efecto adverso del tratamiento con L19IL2 (datos no mostrados).

**[0135]** Para investigar si la reducción inducida por L19IL2 en el crecimiento 30 tumoral es específica del tipo celular, se inyectó ortotópicamente la línea celular de cáncer de páncreas humano MiaPaca en ratones. Una vez establecidos los tumores sólidos, los ratones se aleatorizaron para recibir solución salina al 0,9% o 1,43 MUI/kg PC o 4,29 MUI/kg PC de equivalentes de IL-2 de L19IL2 o IL-2 durante 10 días. Mientras que la IL-2 no dirigida no mostraba ningún efecto terapéutico a la dosis baja, 35 cantidades equimolares de L19IL2 provocaban de forma reproducible una reducción

significativa en la masa tumoral al 10,4% del control ( $p = 0,0003$ ), siendo de este modo significativamente superior (8 veces) a la IL-2 no dirigida ( $p = 0,0003$ ). A la dosis alta, la IL-2 no dirigida logró reducir de forma significativa el volumen tumoral al 47,3% ( $p = 0,0205$ ) del control. Sin embargo, la administración de cantidades equimolares de L19IL2 consiguió inhibir el crecimiento tumoral al 16,8% del control ( $p = 0,0007$ ), siendo de este modo 3 veces más eficaz que la IL-2 no dirigida, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,0513$ ) (fig. 2D).

### **L19IL2 reduce significativamente o elimina las metástasis establecidas del cáncer de páncreas**

10 **[0136]** Una vez demostrada la eficacia de L19IL2 para el tratamiento de tumores de páncreas primarios, los inventores exploraron a continuación su potencia en la enfermedad metastásica. Para ello, se inyectaron ortotópicamente en los ratones células MiaPaca transfectadas de forma estable con un constructo de ADN de Ang2 (MiaPaca-A2), lo que provocó una propagación metastásica del cáncer de páncreas hacia los

15 nódulos linfáticos intraabdominales y el hígado. Las metástasis se verificaron por tinción inmunohistoquímica de pancitoqueratina humana y seguidamente se investigó la expresión de ED-B FN. Sistemáticamente todos los nódulos linfáticos estaban infiltrados por células neoplásicas y todas las metástasis en el hígado mostraron una inmunorreactividad para ED-B FN, pero no así los nódulos linfáticos y el hígado no

20 infiltrados. En base a esta observación, los ratones que presentaban tumores de páncreas ortotópicos MiaPaca-A2 con metástasis preestablecidas en los nódulos linfáticos se trataron aleatoriamente con vehículo o L19IL a 4,29 MUI/kg PC durante 10 días (días 60 a 64 y 67 a 71). Al final del tratamiento se sacrificaron todos los ratones y se calcularon el volumen del tumor primario así como el área de los nódulos

25 linfáticos. Aparte de una reducción significativa del volumen del tumor primario, L19IL2 disminuyó considerablemente el área media de los nódulos linfáticos a menos del 20% de la observada en los controles tratados con vehículo ( $p = 0,0120$ ) (fig. 3D, barras blancas). La verificación de las metástasis de los nódulos linfáticos por inmunotinción de pancitoqueratina reveló grandes células polimorfonucleares con una

30 fuerte inmunorreactividad para citoqueratina en los nódulos linfáticos en el 80% de los ratones control frente al 20% de los ratones tratados con L19IL2. Sin embargo, la mayoría de los nódulos linfáticos de los ratones tratados con L19IL2 mostraban pequeñas células similares a granulocitos positivas para citoqueratina, lo que sugiere una reacción cruzada de los anticuerpos dirigidos contra citoqueratina con epítomos

35 asociados a gránulos en los granulocitos, que ha sido descrita previamente (Streicher J,

Fabian B, Herkner K, Pointner H, Bayer PM. Anticytokeratins are a potential source of false-positive indirect immunofluorescence assays for C-ANCA. *J Clin Lab Anal* 1998; 12:54-59). Para aclarar adicionalmente si estas células similares a granulocitos pero positivas para citoqueratina representan células neoplásicas o inflamatorias, los 5 nódulos linfáticos se exploraron en busca de infiltración de células cancerosas humanas mediante la realización de una ADN-PCR para la detección de un fragmento humano específico de 850 pb en el ADN  $\alpha$ -satélite del cromosoma 17 humano. Se pudieron detectar productos de amplificación de la PCR del tamaño esperado en los nódulos linfáticos de todos los ratones control positivos, pero sólo en el 33% de los 10 ratones tratados con L19IL2. Por lo tanto, el tratamiento con L19IL2 produjo una reducción significativa de las metástasis en los nódulos linfáticos ( $p = 0,0275$ ) (fig. 3D, barras sombreadas).

#### **Efectos antitumorales de L19IL2 dependientes de la pauta de administración**

**[0137]** Para la evaluación de la actividad antitumoral de L19IL2 dependiente de la 15 pauta de administración, los ratones inyectados ortotópicamente con células DanG se asignaron al azar al grupo control o de tratamiento con 4,29 MUI/kg PC de L19IL2 según los protocolos siguientes: (a) una vez a la semana, días 7, 14; (b) tres veces a la semana, días 7, 9, 11, 14, 16, 18; (c) cinco veces a la semana, días 7-11 y 14-18 (fig. 4, panel izquierdo). En comparación con los controles, todos los regímenes provocaron 20 un retraso significativo en el crecimiento tumoral. Sin embargo, la administración de L19IL2 los días 7-11, 14-18 dio la mejor respuesta tumoral, reduciendo la masa tumoral al 12% de la observada en los controles, mientras que la disminución del número de inyecciones de L19IL2 estaba asociada con una disminución de la respuesta tumoral, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (fig. 4, 25 panel derecho).

#### **El tratamiento con L19IL2 causa efectos considerables a largo plazo**

**[0138]** Para explorar la cuestión de si L19IL2 es capaz de lograr una remisión 30 sostenible a largo plazo, los ratones con cáncer de páncreas ortotópico DanG se trataron con 4,29 MUI/kg PC de L19IL2 durante 10 días (días 7-11 y 14-18). Seguidamente, los ratones se dejaron de tratar y se siguió la recidiva tumoral por 35 evaluación bisemanal de los niveles de CA 19-9 en suero. Entre la cuarta y la octava semana después de terminar el tratamiento, seis de diez ratones experimentaron un marcado incremento del marcador tumoral en suero asociado con recidiva tumoral y seguidamente murieron a causa de la masa tumoral. Un animal desarrolló un tumor dérmico sin aumento del nivel de CA 19-9 en suero. Cuatro de diez ratones

sobrevivieron sin aumento de los niveles de CA 19-9 en suero durante el periodo de observación de tres meses después de finalizar el tratamiento. La autopsia realizada en este momento no reveló evidencia alguna de recurrencia tumoral y los animales se consideraron curados (fig. 5).

#### 5 **Efecto terapéutico de L19IL2, gemcitabina y de una combinación de éstos en el cáncer de páncreas**

[0139] La gemcitabina es considerada el mejor fármaco citotóxico disponible actualmente para el tratamiento del cáncer de páncreas. Por lo tanto, los inventores compararon el tratamiento con L19IL2 con el de gemcitabina y valoraron si un  
10 tratamiento combinado de estos dos agentes podría proporcionar algún beneficio terapéutico. Con este propósito, el tratamiento convencional del cáncer de páncreas en ratones con tumores ortotópicos DanG con gemcitabina (inyección i.p. de 250 mg/kg PC una vez a la semana, es decir, los días 7 y 14) redujo significativamente el volumen del tumor de páncreas al 28% del de los ratones control. Cabe señalar que el  
15 tratamiento con L19IL2 (inyección i.v. de 4,29 MUI/kg PC los días 8-12 y 15-19) solo redujo el volumen tumoral 2,3 veces más que el tratamiento con gemcitabina ( $p = 0,0095$ ). Además, cuando se combinaron el tratamiento con L19IL2 y gemcitabina, los tumores eran muy pequeños, correspondiendo a una disminución de la masa tumoral a tan solo el 12,4% de la observada en el tratamiento con gemcitabina ( $p = 0,0004$ ) y al  
20 28,53% de la observada en el tratamiento con L19IL2 ( $p = 0,0435$ ), respectivamente (fig. 6). Más aún, mientras que no se logró ninguna remisión completa mediante el tratamiento con gemcitabina sola, el 37% de los ratones que recibieron L19IL2 y el 70% de los ratones que recibieron una combinación de L19IL2 más gemcitabina experimentaron una remisión completa.

#### 25 **Efectos de L19IL2 en la necrosis tumoral, la apoptosis y la proliferación**

[0140] Para identificar los mecanismos subyacentes a la regresión tumoral inducida por L19IL2, los inventores analizaron inicialmente muestras tumorales de ratones tratados con vehículo y L19IL2 por tinción H&E convencional, usando el modelo de cáncer de páncreas ortotópico DanG como modelo representativo. Una de  
30 las características más intrigantes de los tumores tratados con L19IL2 era la extensa necrosis tumoral. De hecho, en los ratones que recibieron L19IL2 la necrosis comprendía el  $42 \pm 10,86\%$  del área tumoral, mientras que en los controles no tratados solo el  $2,5 \pm 2,177\%$  del área tumoral estaba necrosado ( $p = 0,0159$ ) (fig. 7A). El análisis de la apoptosis en el tejido tumoral vital residual mediante el ensayo TUNEL  
35 no reveló diferencias significativas en el índice de células apoptóticas de los ratones

tratados con L19IL2 y los controles tratados con vehículo (fig. 7B). Por el contrario, el análisis por inmunotinción Ki67 de células proliferativas demostró que la relación de células en división estaba sustancialmente reducida (4,6 veces) en los tumores de los ratones tratados con L19IL2 en comparación con los controles no tratados ( $p = 0,0177$ ) (fig. 7C).

#### **Identificación de las células efectoras inmunológicas que median la respuesta antitumoral inducida por L19IL2**

[0141] Aparte de la extensa necrosis tumoral, la tinción H&E de los tumores tratados con L19IL2 demostró un infiltrado inflamatorio sustancial de células redondas que no se detectó en los controles no tratados. Para identificar mejor las células efectoras inmunológicas que median la inhibición del crecimiento tumoral inducida por L19IL2, se sometieron muestras tumorales a una valoración inmunohistológica de células CD11b+, que incluyen predominantemente macrófagos, y de células NK. De hecho, se detectó un número más de cuatro veces mayor de células CD11b+ en los tumores de animales tratados con L19IL2 que en los controles no tratados ( $p = 0,0012$ ) (fig. 8A), y, lo que es aún más sorprendente, se demostró un incremento de más de 70 veces en la infiltración de células NK (fig. 8B), lo que sugiere que las células NK son los actores principales de la respuesta antitumoral inducida por L19IL2. Para confirmar adicionalmente el presunto papel de las células NK, los inventores estudiaron la cuestión de si la reducción de células NK mediante un anticuerpo dirigido contra ASGM-1 interfería con la eficacia terapéutica de L19IL2. Con este propósito, los ratones injertados ortotópicamente con células DanG se asignaron al azar a los siguientes grupos de tratamiento: tratamiento NK competente + solución salina, tratamiento NK deficiente + solución salina, tratamiento NK deficiente + L19IL2 (4,29 MUI/kg PC de L19 los días 7-11, 14-18) y tratamiento NK competente + L19IL2 (4,29 MUI/kg PC de L19 los días 7-11, 14-18). En concordancia con los datos inmunohistológicos de los inventores, el tratamiento con L19IL2 no produjo una regresión tumoral significativa en los ratones NK deficientes en comparación con los ratones NK deficientes o NK competentes tratados con vehículo. Sin embargo, L19IL2 era más de cinco veces más eficaz en los ratones NK competentes que en los NK deficientes (fig. 8C).

#### **Leyendas de las figuras**

[0142]

**Figura 1.** Expresión de ED-B FN en carcinoma de páncreas humano y en dos modelos ortotópicos de cáncer de páncreas en ratones sin pelo. La

expresión de ED-B FN se cuantificó por análisis de imágenes asistido por ordenador. Los valores indicados expresan el área inmunoteñida en porcentaje del área marco de medición, indicando las líneas la cantidad media de ED-B FN de cada grupo. \*:  $p < 0,001$  frente al carcinoma de

5

páncreas humano.

**Figura 2.** Efectos terapéuticos de L19IL2 en el cáncer de páncreas ortotópico en ratones sin pelo. A-C Se inyectó ortotópicamente la línea celular de cáncer de páncreas humano DanG en ratones sin pelo. Una vez establecidos los tumores sólidos, se trataron aleatoriamente grupos de 10 a

10 12 ratones durante 10 días como se ha indicado (días 7-11, 14-18 después del trasplante de células tumorales). El día 21 se sacrificaron todos los ratones y se calculó el volumen tumoral (A, C). (A) Panel izquierdo: Se administró a los ratones solución salina al 0,9% o las concentraciones indicadas de equivalentes de IL-2, bien como L19IL2 o bien como IL-2 no dirigida. Los datos mostrados representan el volumen tumoral medio  $\pm$  error típico de la media (SEM) de cada grupo de tratamiento. \*:  $p < 0,004$  (frente al control); +:  $p = 0,0003$  (frente a cantidades equimolares de IL-2). Panel derecho: Los ratones se trataron con solución salina, 4,29 MUI/kg PC de L19IL2 o cantidades equimolares del fragmento de anticuerpo homodimérico scFvL19. Los valores se expresan en porcentaje del volumen tumoral de los controles tratados con vehículo. \*:  $p \leq 0,004$  (frente al control y L19). (B) Panel izquierdo: Se recogieron muestras de sangre de 8 a 908  $\text{mm}^3$  de volumen de ratones con tumores y de ratones sin tumor, los cuales sirvieron de controles negativos. Las concentraciones de CA 19-9 en suero se determinaron mediante un inmunoensayo quimioluminiscente y se representó para cada animal individual el nivel de CA 19-9 frente al volumen tumoral.  $N = 56$ ,  $r = 0,7332$ ,  $p < 0,0001$ . Panel derecho: Se recogieron muestras de sangre de ratones tratados con vehículo o L19IL2 en los momentos indicados y se determinaron los niveles de CA 19-9 en suero. Cada punto representa la media  $\pm$  SEM del grupo control o de tratamiento. \*:  $p < 0,05$ . (C) Los ratones se asignaron al azar a los grupos de tratamiento indicados. Al final del tratamiento se recogieron muestras de sangre y se analizó la lipasa en sangre mediante un ensayo colorimétrico cinético. Los valores mostrados representan la media  $\pm$  SEM de cada grupo de

15 20 25 30 35

trasplantó ortotópicamente en ratones sin pelo. Se dejó que se estableciera el tumor sólido hasta el día 40 y seguidamente los ratones se trataron con solución salina o las concentraciones indicadas de L19IL2 o IL-2 no dirigida los días 40-44, 47-51 después de la inoculación de las células tumorales. El día 54 se sacrificaron todos los ratones y se calculó el volumen tumoral. Los datos mostrados se expresan como media  $\pm$  SEM de cada grupo de tratamiento. \*:  $p \leq 0,0007$  (frente al control); +:  $p = 0,0003$  (L19IL2 1,43 MUI/kg PC frente a cantidades equimolares de IL-2); ++:  $p = 0,0513$  (L19IL2 4,29 MUI/kg PC frente a cantidades equimolares de IL-2).

**Figura 3.** Efectos terapéuticos de L19IL2 en metástasis establecidas de xenoinjertos ortotópicos de cáncer de páncreas en ratones sin pelo. Se inyectaron ortotópicamente células de la línea celular de cáncer de páncreas humano MiaPaca, transfectada de forma estable con un constructo de ADN de angiopoyetina-2, en ratones sin pelo, lo que provocó la propagación metastásica del cáncer de páncreas hacia los nódulos linfáticos intraabdominales y el hígado. El área de los nódulos linfáticos se calculó determinando el diámetro más grande y su diámetro perpendicular y calculando el producto de las dos mediciones. Los valores indicados representan el área media de los nódulos linfáticos  $\pm$  SEM de los grupos control y de tratamiento. Los nódulos linfáticos se analizaron respecto a infiltración tumoral por inmunotinción de pancitoqueratina. En la figura se resumen los resultados de la PCR de ADN humano específico. Los datos mostrados expresan el número de ratones con nódulos linfáticos positivos en la PCR en porcentaje de ratones tratados con vehículo o L19IL2, respectivamente. \*:  $p = 0,0275$ .

**Figura 4.** Efectos antitumorales de L19IL2 dependientes de la pauta de administración. A ratones sin pelo con tumores de páncreas ortotópicos DanG se les administró por vía i.v. vehículo (solución salina al 0,9%) o 4,29 MUI/kg PC de L19IL2 según las pautas de tratamiento representadas en el panel izquierdo. El día 21 se sacrificaron todos los ratones y se calculó el volumen del tumor de páncreas (panel derecho). Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM de cada grupo de tratamiento. \*:  $p \leq 0,0001$  frente al control de solución salina.

**Figura 5.** Efectos a largo plazo del tratamiento con L19IL2. Diez ratones sin pelo con cáncer de páncreas ortotópico DanG se trataron con 4,29 MUI/kg

PC de L19IL2 los días 7-11, 14-18 después del trasplante de células tumorales y seguidamente se dejaron de tratar. Al final del tratamiento, y repetidas veces bisemanalmente, se recogieron muestras de sangre de los ratones y se determinaron los niveles de CA 19-9 en suero. Los datos mostrados representan los niveles de CA 19-9 en suero de cada animal individual.

**Figura 6.** Eficacia del tratamiento con L19IL2, gemcitabina y una combinación de ellos en el cáncer de páncreas en ratones sin pelo. Los ratones con tumores de páncreas ortotópicos DanG se sometieron a un tratamiento i.p. con 250 mg/kg PC de gemcitabina una vez a la semana (días 7, 14), a una inyección i.v. de 4,29 MUI/kg PC de L19IL2 los días 8-12, 15-19, a un tratamiento combinado de L19IL2 y gemcitabina o a un tratamiento con vehículo (solución salina al 0,9%). El día 21 se sometieron a eutanasia todos los ratones y se calculó el volumen tumoral. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM de cada grupo de tratamiento. \*:  $p < 0,01$  frente al control, x:  $p < 0,01$  frente a gemcitabina, +:  $p = 0,0435$  frente a L19IL2.

**Figura 7.** Efectos de L19IL2 en la necrosis tumoral, la apoptosis y la proliferación. Se trataron ratones con tumores ortotópicos DanG por vía i.v. con solución salina al 0,9% o con 4,29 MUI/kg PC de L19IL2. Panel izquierdo: Una vez terminado el tratamiento, los tumores se examinaron por tinción H&E convencional (A), la apoptosis se valoró mediante el ensayo TUNEL (B) y las células proliferativas se visualizaron por tinción Ki67 (C). Se muestran ejemplos representativos de tumores tratados con vehículo y tratados con L19IL2. Panel derecho: (A) Para la cuantificación de la necrosis se marcaron las áreas tumorales necrótica y total a baja potencia ( $\times 2,5$ ). Las áreas se calcularon mediante un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador, y la relación área tumoral necrótica/ área tumoral total se expresa en porcentaje. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM de cada grupo. \*:  $p = 0,0159$ . Para la cuantificación de la apoptosis (B) y del índice de proliferación (C) se calculó la relación de células tumorales positivas/ células tumorales totales. Los resultados se expresan en porcentaje y representan la media  $\pm$  SEM de cada grupo. \*:  $p = 0,0177$  (A, escala 500  $\mu\text{m}$ , B, C, escala 100  $\mu\text{m}$ ).

**Figura 8.** Identificación de las células efectoras inmunológicas que median

la regresión tumoral inducida por L19IL2. (A, B) A los ratones sin pelo con tumores de páncreas ortotópicos DanG se les administró por vía i.v. solución salina al 0,9% o 4,29 MUI/kg PC de L19IL2. Una vez completado el tratamiento, los tumores se tiñeron con un anticuerpo CD11b que reconoce predominantemente macrófagos (A) y con un anticuerpo NK1.1 específico de células NK (B). Panel izquierdo: Se muestran ejemplos representativos de ratones tratados con vehículo y tratados con L19IL2 (escala, 100  $\mu$ m). La infiltración de células CD11b<sup>+</sup> (A) y de células NK (B) se cuantificó por análisis de imágenes asistido por ordenador. Los resultados mostrados representan el área inmunoteñida en porcentaje del área marco de medición y se expresan como media  $\pm$  SEM de cada grupo. \* P = 0,0159 (A), \* P = 0,0012 (B). (C) Los ratones sin pelo con tumores ortotópicos DanG se asignaron al azar a los grupos de tratamiento indicados. Una vez terminado el tratamiento se determinó el volumen tumoral. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de cada grupo. \* P < 0,01 frente a cualquier otro grupo.

## LISTADO DE SECUENCIAS

**[0143]**

<110> Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft  
 <120> Combinación de una proteína de fusión entre un anticuerpo contra el dominio EDb de la fibronectina e IL2 con gemcitabina  
 <130> 53381AWO  
 <150> EP06090054.5  
 <151> 07/04/2006  
 <150> US 60/796,866  
 <151> 03/06/2006  
 <160> 11  
 <170> PatentIn versión 3.1  
 <210> 1  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)...(116)  
 <223> Región VH de anticuerpo de L19

&lt;400&gt; 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 108

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DOMINIO

&lt;222&gt; (1)...(108)

10 &lt;223&gt; Región VL de anticuerpo de L19

&lt;400&gt; 2

50

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro  
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(12)

<223> Región conectora del anticuerpo

10 <406> 3

Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser  
 1 5 10

<210> 4

<211> 133

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(133)

<223> Interleucina-2 humana

20 <400> 4

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile  
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr  
 130

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(17)

<223> Conector de la proteína de fusión

10 <400> 5

Glu Phe Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser  
 1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)...(5)  
 5 <223> CDR1 VH L19  
 <400> 6

**Ser Phe Ser Met Ser**  
**1 5**

<210> 7  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)...(7)  
 15 <223> CDR3 VH L19  
 <400> 7

**Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr**  
**1 5**

<210> 8  
 <211> 17  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)...(17)  
 25 <223> CDR2 VH L19  
 <400> 8

**Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

<210> 9  
 <211> 12  
 30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(12)

5 <223> CDR1 vl L19

<400> 9

**Arg Ala ser Gln ser val Ser Ser Ser Phe Leu Ala**  
**1 5 10**

<210> 10

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(7)

15 <223> CDR2 vl L19

<400> 10

**Tyr Ala ser Ser Arg Ala Thr**  
**1 5**

<210> 11

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(9)

25 <223> CDR3 vl L19

<400> 11

**Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr**  
**1 5**

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende al menos (i) una proteína de fusión y (ii) gemcitabina, en la que la proteína de fusión comprende una parte de anticuerpo que  
5 reconoce específicamente el dominio ED<sub>b</sub> de la fibronectina y una parte de interleucina-2, y en la que la combinación sirve para el uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer.
2. Una combinación para el uso según la reivindicación 1, en la que la  
10 proteína de fusión presenta una parte de anticuerpo N-terminal y una parte de interleucina-2 C-terminal o en la que la proteína de fusión presenta una parte de interleucina-2 N-terminal y una parte de anticuerpo C-terminal.
3. Una combinación para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que la  
15 proteína de fusión presenta un conector de la proteína de fusión que conecta la parte de anticuerpo y la parte de interleucina-2.
4. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a  
20 3, en la que la parte de anticuerpo se une específicamente al dominio oncofetal ED<sub>b</sub> de la fibronectina con una afinidad sub-nanomolar.
5. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a  
4, en la que la parte de anticuerpo comprende las secuencias conforme a SEQ ID NO:  
6 a 11.  
25
6. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a  
5, en la que la parte de anticuerpo comprende al menos una cadena pesada V conforme  
a la SEQ ID NO: 01 y al menos una cadena ligera V conforme a la SEQ ID NO: 02.
- 30 7. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a  
6, en la que la parte de anticuerpo comprende una cadena pesada V conforme a la SEQ  
ID NO: 01 y una cadena ligera V conforme a la SEQ ID NO: 02.
8. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a  
35 7, en la que las cadenas pesada y ligera están conectadas a través de un conector de

anticuerpo.

9. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la parte de interleucina-2 es interleucina-2 humana o una variante 5 funcional de la misma.

10. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que un conector de la proteína de fusión conecta la parte de anticuerpo y la parte de interleucina-2.

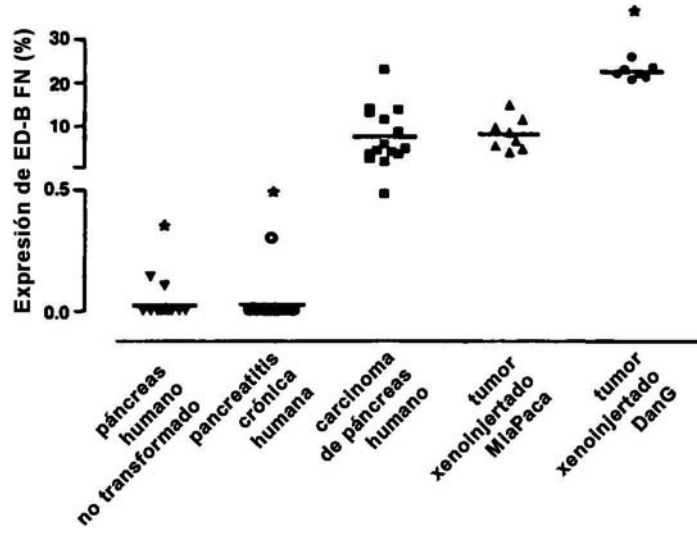
10

11. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la gemcitabina es clorhidrato de gemcitabina.

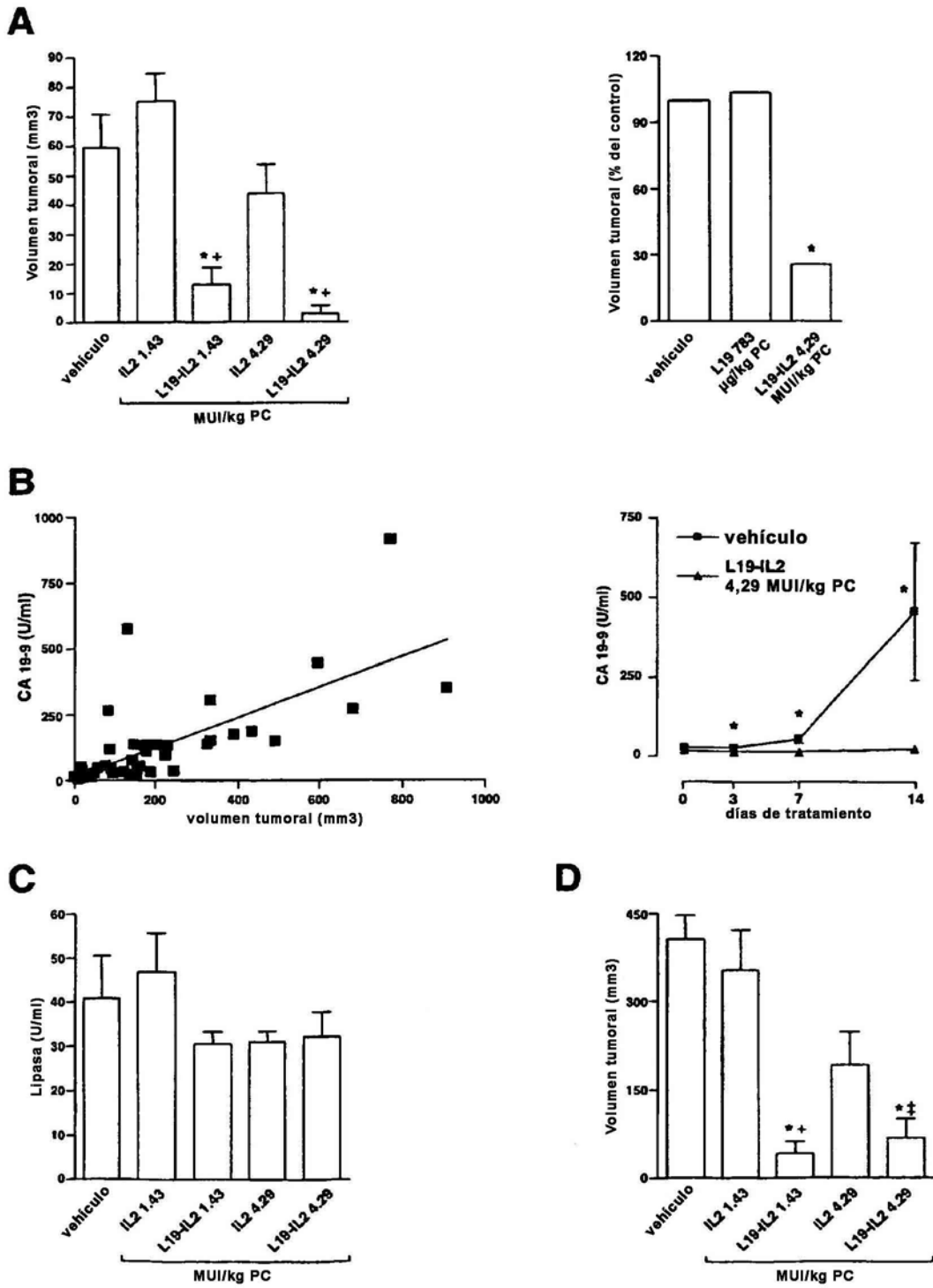
12. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 11, en la que el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de ovario y cáncer de mama.

13. Una combinación para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el cáncer es cáncer de páncreas.

**Fig1**

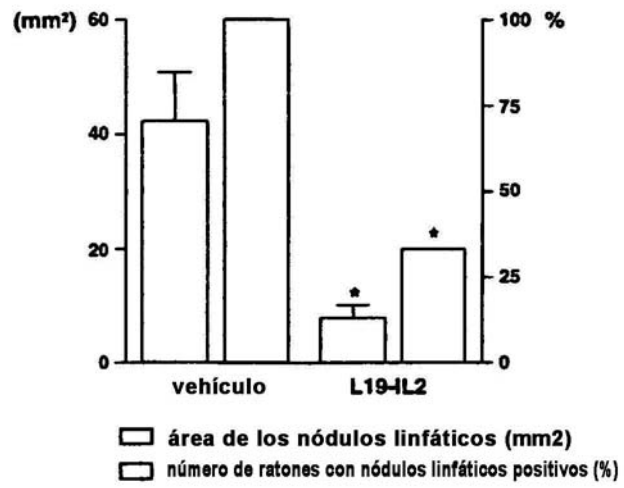


**Fig2**

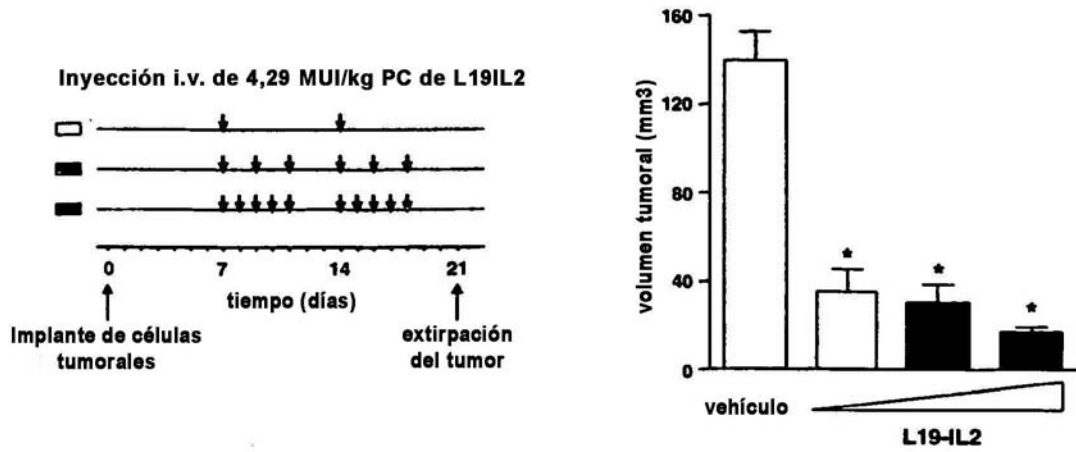


**Fig3**

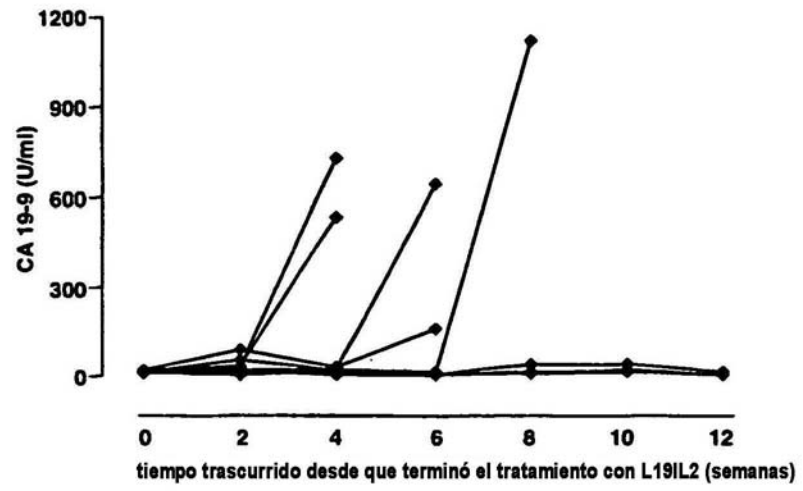
**D**



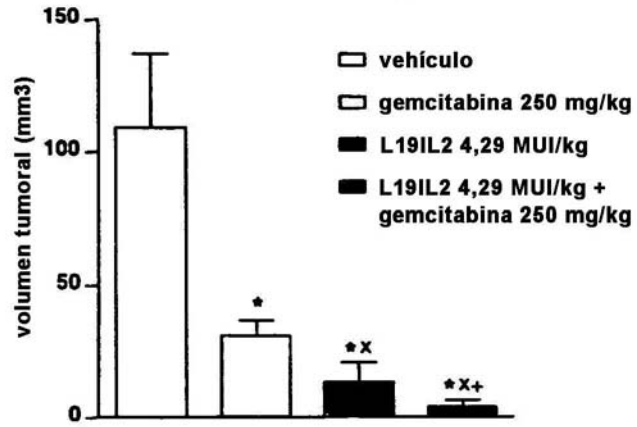
**Fig4**



**Fig5**

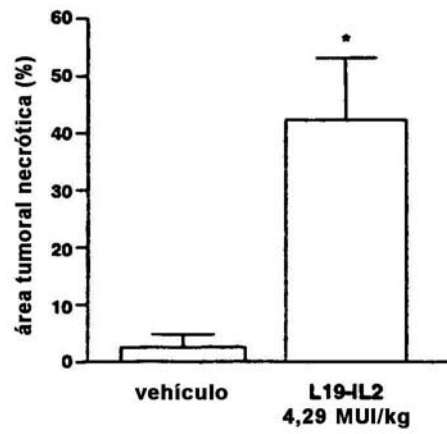


**Fig6**

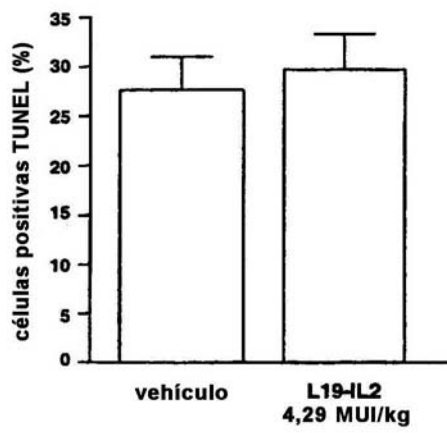


**Fig7**

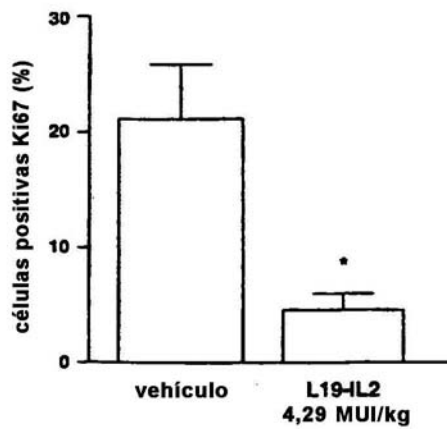
**A**



**B**

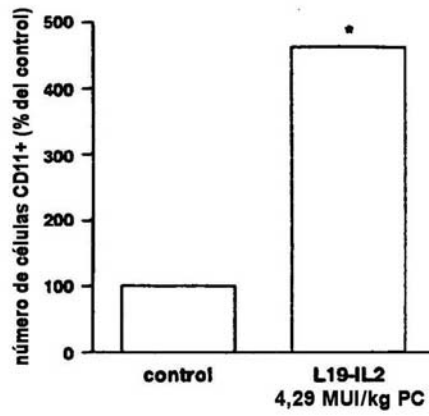


**C**

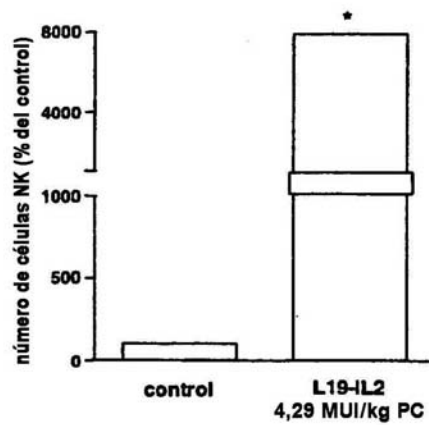


**Fig8**

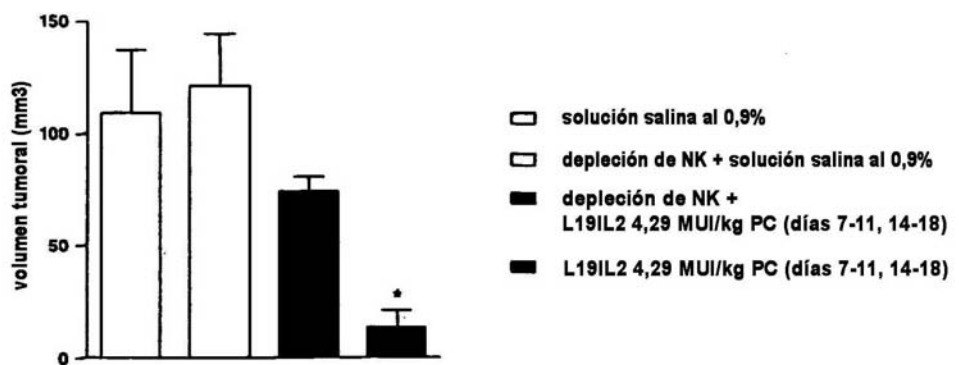
**A**



**B**



**C**



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- |    |  |  |
|----|--|--|
| 10 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• EP 0122707 A [0005]</li> <li>• EP 0184365 A [0005]</li> <li>• EP 727433 A [0005]</li> <li>• WO 9745544 A [0010]</li> <li>• WO 9958570 A [0011] [0109]</li> </ul>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• US 5693780 A [0086]</li> <li>• US 5591669 A [0089]</li> <li>• US 5589369 A [0089]</li> <li>• US 5545807 A [0089]</li> <li>• US 5565332 A [0090]</li> </ul>  |
| 15 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• WO 0162298 A [0012]</li> <li>• EP 0573551 A [0064] [0065]</li> <li>• EP 0623679 A [0064] [0065]</li> <li>• EP 0318554 A [0064] [0065]</li> <li>• EP 0109748 A [0066]</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• US 5573905 A [0090]</li> <li>• US 5567610 A [0090]</li> <li>• US 5229275 A [0090]</li> <li>• WO 9316185 A [0092]</li> <li>• US 5571894 A [0092]</li> <li>• US 5587458 A [0092]</li> <li>• US 5641870 A [0092]</li> <li>• WO 0220563 A [0109]</li> </ul> |
| 20 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• EP 136489 A [0066]</li> <li>• US 5500362 A [0067]</li> <li>• US 5821337 A [0067]</li> <li>• US 4816567 A [0081] [0083] [0087]</li> <li>• EP 0404097 A [0082]</li> </ul>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• WO 200537312 A [0109]</li> <li>• EP 06090054 A [0143]</li> <li>• US 60796866 B [0143]</li> </ul>  |
| 25 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• WO 9311161 A [0082]</li> <li>• US 4S16567 A [0085]</li> </ul>   |  |

**Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción**

- |    |  |
|----|--|
| 30 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Parker SL ; Tong T ; Bolden S ; Wingo PA. Cancer statistics. CA Cancer J Clin, 1997, vol. 47, 5-27 [0002]</li> <li>• Rosewicz S ; Wiedenmann B. Pancreatic carcinoma. Lancet, 1997, vol. 349, 485-489 [0002]</li> <li>• Cohen SJ ; Pinover WH ; Watson JC ; Meropol NJ. Pancreatic cancer. Curr Treat</li> </ul>  |
| 35 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Options Oncol, 2000, vol. 1, 375-386 [0002]</li> <li>• Burris HA, III ; Moore MJ ; Andersen J ; Green MR ; Rothenberg ML ; Modiano MR ; Cripps MC ; Portenoy RK ; Storniolo AM ; Tarassoff P. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol, 1997, vol. 15, 2403-2413 [0002]</li> </ul>                                 |
| 40 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bosslet K ; Straub R ; Blumrich M ; Czech J ; Gerken M ; Sperker B ; Kroemer HK ; Gesson JP ; Koch M ; Monneret C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. Cancer Res, 1998, vol. 58, 1195-1201 [0002] [0018]</li> <li>• Folli S ; Pelegrin A ; Chalandon Y ; Yao X ; Buchegger F ; Lienard D ; Lejeune F ; Mach JP. Tumor-necrosis factor can enhance radio-antibody uptake in human colon</li> </ul> |

- carcinoma xenografts by increasing vascular permeability. *Int J Cancer*, 1993, vol. 53, 829-836 [0002]
- Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, 1987, vol. 47, 3039-3051 [0002]
  - 5 • Jones AL ; Selby P. Tumor necrosis factor: clinical relevance. *Cancer surveys*, 1989, vol. 8, 817-836 [0002]
  - Halin C ; Zardi L ; Neri D. Antibody-based targeting of angiogenesis. *News Physiol Sci*, 2001, vol. 16, 191-194 [0002]
  - Alessi P ; Ebbinghaus C ; Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim*
  - 10 *Biophys Acta*, 2004, vol. 1654, 39-49 [0002] [0003]
  - Castellani P ; Viale G ; Dorcaratto A ; Nicolo G ; Kaczmarek J ; Querze G ; Zardi L. The fibronectin isoform containing the ED - B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer.*, 01 December 1994, vol. 59 (5), 612-8 [0003]
  - *Int J Cancer*, 04 July 1995, vol. 62 (1), 118 [0003]
  - 15 • Viti F ; Tarli L ; Giovannoni L ; Zardi L ; Neri D. Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res*, 1999, vol. 59, 347-352 [0003]
  - Santimaria M ; Moscatelli G ; Viale GL ; Giovannoni L ; Neri G ; Viti F ; Leprini A ; Borsi L ; Castellani P ; Zardi L. Immunoscintigraphic detection of the ED - B domain
  - 20 of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res*, 2003, vol. 9, 571-579 [0003]
  - Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med*, 2001, vol. 250, 462-475 [0003] [0022]
  - Bubenik J ; Den Otter W ; Huland E. Local cytokine therapy of cancer: interleukin-2,
  - 25 interferons and related cytokines. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, vol. 49, 116-122 [0003] [0118]
  - Baluna R ; Rizo J ; Gordon BE ; Ghetie V ; Vitetta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, vol. 96, 3957-
  - 30 3962 [0003] [0118]
  - Den Otter W ; Dobrowolski Z ; Bugajski A ; Papla B ; Van Der Meijden AP ; Koten JW ; Boon TA ; Siedlar M ; Zembala M. Intravesical interleukin-2 in T1 papillary bladder carcinoma: regression of marker lesion in 8 of 10 patients. *J Urol*, 1998, vol. 159, 1183-1186 [0003]
  - 35 • Baselmans AH ; Koten JW ; Battermann JJ ; Van Dijk JE ; Den Otter W. The mechanism of regression of solid SL2 lymphosarcoma after local IL-2 therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, vol. 51, 492-498 [0003]
  - Krastev Z ; Koltchakov V ; Popov D ; Alexiev A ; Koten JW ; Den Otter W. A case of hepatocellular carcinoma (HCC): treatment with local application of alcohol and
  - 40 interleukin 2 (IL-2). *Hepatogastroenterology*, 2003, vol. 50, 1647-1649 [0003]
  - Carnemolla B ; Borsi L ; Balza E ; Castellani P ; Meazza R ; Berndt A ; Ferrini S ; Kosmehl H ; Neri D ; Zardi L. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, 2002, vol. 99, 1659-1665 [0003]
  - 45 • Folkmann. *Nat. Med.*, 1995, vol. 1, 27 [0004]

- O'Reilly et al. *Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 689 [0004]
- O'Reilly et al. *Cell*, 1997, vol. 88, 277 [0004]
- Friedlander et al. *Science*, 1995, vol. 270, 1500 [0004]
- Pasqualini et al. *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 542 [0004]
- 5 • Huang et al. *Science*, 1997, vol. 275, 547 [0004]
- Kim et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 841 [0004]
- Schmidt - Erfurth et al. *Br. J. Cancer*, 1997, vol. 75, 54 [0004]
- Blackstock A.W. et al. *J. Clin. Oncol.*, 1999, vol. 17, 2208-2212 [0006]
- Mose S. et al. *Strahlenther Onkol.*, 2002, vol. 178, 59-70 [0006]
- 10 • Gold DV et al. *Clin. Can. Res.*, 2003, vol. 9, 3929s-3937s [0006]
- Taniguchi et al. *Cell*, 1993, vol. 73, 5-8 [0007]
- Rosenberg. *J. Clin. Oncol.*, 1992, vol. 10, 180-199 [0007]
- Siegel ; Puri. Interleukin-2 toxicity in *J. Clin. Oncol.*, 1991, vol. 9, 694-704 [0007]
- Lode et al. *Pharmacol. Ther.*, 1998, vol. 80, 277-292 [0007]
- 15 • Lode et al. *PNAS USA*, 1999, vol. 96, 8591-8596 [0008]
- Zardi et al. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 2337-2342 [0009]
- Carnemolla et al. *J. Cell Biol.*, 1989, vol. 108, 1139-1148 [0009]
- Castellani et al. *Int. J. Cancer*, 1994, vol. 59, 612-618 [0009]
- Tarli et al. *Blood*, 1999, vol. 94, 192-198 [0009]
- 20 • Viti et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 347 [0009]
- Pini et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 21769-21776 [0012]
- De Mik HJ ; Koten JW ; Maas RA ; Dullens HF ; Den Otter W. Tumour regression by IL-2 mediated stagnation of blood flow. *In Vivo*, 1991, vol. 5, 679-684 [0022]
- Sakkoula E ; Pipili-Synetos E ; Maragoudakis ME. Involvement of nitric oxide in the
- 25 inhibition of angiogenesis by interleukin-2. *Br J Pharmacol*, 1997, vol. 122, 793-795 [0022]
- Baluna R ; Rizo J ; Gordon BE ; Ghetie V ; Vitetta ES. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 96, 3957-
- 30 3962 [0022]
- Albertsson PA ; Basse PH ; Hokland M ; Goldfarb RH ; Nagelkerke JF ; Nannmark U ; Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol*, 2003, vol. 24, 603-609 [0022]
- Di Carlo E ; Meazza R ; Basso S ; Rosso O ; Comes A ; Gaggero A ; Musiani P ;
- 35 Santi L ; Ferrini S. Dissimilar anti-tumour reactions induced by tumour cells engineered with the interleukin-2 or interleukin-15 gene in nude mice. *J Pathol*, 2000, vol. 191, 193-201 [0022]
- Tarli L ; Balza E ; Viti F ; Borsi L ; Castellani P ; Berndorff D ; Dinkelborg L ; Neri D ; Zardi L. A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood*,
- 40 1999, vol. 94, 192-198 [0022]
- Masztalerz A ; Van Rooijen N ; Den Otter W. Everse LA. Mechanisms of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12 mediated tumour regression. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, vol. 52, 235-242 [0023]

- Basse PH ; Whiteside TL ; Herberman RB. Use of activated natural killer cells for tumor immunotherapy in mouse and human. *Methods Mol Biol*, 2000, vol. 121, 81-9 [0023]
- Janssen RA ; Sleijfer DT ; Heijn AA ; Mulder NH ; The TH ; de Leij L. Peripheral  
5 blood lymphocyte number and phenotype prior to therapy correlate with response in subcutaneously applied rIL-2 therapy of renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, 1992, vol. 66, 1177-1179 [0023]
- Ned et al. *Trends in Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 465-470 [0029] [0046]
- Bird et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0064]
- 10 • Huston et al. *PNAS USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0064]
- Meazza R ; Marciano S ; Sforzini S et al. Analysis of IL-2 receptor expression and of the biological effects of IL-2 gene transfection in small-cell lung cancer. *Br.J.Cancer.*, 1996, vol. 74, 788-795 [0066]
- Ravetch ; Kinet. *Annu. Rev. Immunol*, 1991, vol. 9, 457-92 [0067] [0069]
- 15 • Clynes et al. *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0067]
- Daeron. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0069]
- Capel et al. *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0069]
- de Haas et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0069]
- Guyer et al. *J. Immunol.*, 1976, vol. 1 1, 7587 [0069]
- 20 • Kim et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0069]
- Kabat et al. *Sequences of Proteins Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991 [0074]
- Plückthun. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-3 15 [0080]
- 25 • McCafferty et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0081]
- Clackson et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0081] [0084] [0090]
- Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0081] [0084] [0090]
- Marks et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0081]
- Waterhouse et al. *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0081]
- 30 • Morrison et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 8 1, 685 1 [0081]
- Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5444-6448 [0082]
- Kohler et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0083]
- Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 8 1, 685 1-6855 [0085]
- Jones et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0087]
- 35 • Riechmann et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0087]
- Verhoeyen et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0087]
- Sims et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0087]
- Chothia et al. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0087]
- Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0087]
- 40 • Presta et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0087]
- Jakobovits et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0089]
- Jakobovits et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0089]
- Bruggermann et al. *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0089]
- McCafferty et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0090]

- Johnson, Kevin S. ; Chiswell, David J. *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, vol. 3, 564-571 [0090]
- Griffith. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0090]
- Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1991 [0091]
- 5 • Chothia ; Lesk. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0091]
- Morimoto et al. *Journal of Biochemical und Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0092]
- Brennan et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0092]
- 10 • Carter et al. *Biotechnology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0092]
- Cunningham ; Welk. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0095]
- Caron et al. *J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0104]
- Shopes, B. J. *Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0104]
- Wolff et al. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0104]
- 15 • Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0104]
- Pini et al. *J Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 21769-21776 [0109]
- Abdel-Wahab M ; El Shennawy F ; Agha S ; Ragab E ; Fathi O ; Sultan A ; Elghawalby N ; Ezzat F. Evaluation of cell mediated immunity in advanced pancreatic carcinoma before and after treatment with interleukin-2 (IL-2). *Hepatogastroenterology*, 1996, vol. 46 (1), 1293-1296 [0118]
- 20 • Lygidakis NJ ; Vlachos L ; Raptis S ; Sgourakis G ; Mourikis D ; Kehagias D. Consecutive re-explorations for final resection of initially unresectable pancreatic head carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 1999, vol. 46, 2229-2239 [0118]
- Alves F ; Contag S ; Missbach M ; Kaspereit J ; Nebendahl K ; Borchers U ; Heidrick B ; Streich R ; Hiddemann W. An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of the metastatic cascade. *Pancreas*, 2001, vol. 23, 227-235 [0123]
- 25 • Peron JM ; Couderc B ; Rochaix P ; Douin-Echinard V ; Asnacios A ; Souque A ; Voigt JJ ; Buscail L ; Vinel JP ; Favre G. Treatment of murine hepatocellular carcinoma using genetically modified cells to express interleukin-12. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, vol. 19, 388-396 [0124]
- 30 • Becker M ; Nitsche A ; Neumann C ; Aumann J ; Junghahn I ; Fichtner I. Sensitive PCR method for the detection and real time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer*, 2002, vol. 87, 1328-1335 [0129]
- 35 • Streicher J ; Fabian B ; Herkner K ; Pointner H ; Bayer PM. Anticytokeratins are a potential source of false-positive indirect immunofluorescence assays for C-ANCA. *J Clin Lab Anal*, 1998, vol. 12, 54-59 [0136]