

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 329**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2021** **PCT/EP2021/063758**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2021** **WO21234178**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2021** **E 21726426 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 4153232**

54 Título: **Terapia con el inmunoconjugado de TNF-a para el tratamiento de tumores cerebrales**

30 Prioridad:

22.05.2020 EP 20176157

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2024

73 Titular/es:

PHILOGEN S.P.A. (100.0%)
La Lizza 7
53100 Siena, IT

72 Inventor/es:

HEMMERLE, THERESA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 987 329 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia con el inmunoconjugado de TNF- α para el tratamiento de tumores cerebrales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un inmunoconjugado del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) para su uso en un método para tratar un tumor cerebral en un paciente, especialmente glioma, comprendiendo el método administrar el inmunoconjugado de TNF α en combinación con quimioterapia al paciente, en donde el inmunoconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) L19, en donde L19 H- y L-CDR1-3 son respectivamente las SEQIDNO:1-6, y en donde la quimioterapia es lomustina.

15 Antecedentes de la invención

Los tumores cerebrales comprenden tumores primarios y secundarios. Los tumores cerebrales primarios son neoplasias que se originan a partir de células del cerebro o de las meninges, a diferencia de los tumores cerebrales secundarios como las metástasis cerebrales o los linfomas malignos (PCNSL), que se originan fuera del sistema nervioso central (SNC).

El glioma es un tipo de tumor que se presenta en el cerebro y la médula espinal y comienza en las células gliales del cerebro o la columna. Un glioma puede afectar a la función cerebral y poner en peligro la vida, dependiendo de su ubicación y tasa de crecimiento. Los gliomas junto con los meningiomas, son los tipos más comunes de tumores cerebrales primarios. Se clasifican histológicamente según el tipo de célula glial implicada en la tumorigénesis (astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias) y molecularmente según características genéticas, lo que puede ayudar a predecir cómo se comportará el tumor con el tiempo y qué tratamientos tienen más probabilidades de funcionar.

Los gliomas se clasifican según el sistema de cuatro niveles de la OMS, que van del grado I al IV, indicando la malignidad.

Grado I: Tumores bien delimitados de crecimiento lento con pronóstico favorable

Grado II: Tumores de crecimiento lento, a menudo con un crecimiento invasivo del cerebro que impide la resección completa

Grado III: Tumores de alto grado de rápido crecimiento con características de anaplasia, particularmente celularidad alta, pleomorfismo celular, aumento de la atipia nuclear y actividad mitótica enérgica

Grado IV ("glioblastoma"): la mayoría de los gliomas malignos que muestran las características de grado III y proliferación microvascular patológica adicional y áreas de necrosis.

La piedra angular del tratamiento del glioma es la mayor resección posible pero no funcional, que puede ser curativo en el caso del glioma de grado I de la OMS. Para los gliomas difusos de grado II a IV de la OMS, a menudo es posible una resección macroscópicamente completa, pero el carácter infiltrante difuso de la enfermedad significa que ésta no suele ser una resección curativa. En los gliomas, la extensión de la resección es un factor pronóstico. La radioterapia (RT) postoperatoria mejora la supervivencia, el tiempo de RT puede variar según los factores de riesgo y el grado de la OMS. El tercer pilar de la terapia es la terapia tumoral basada en fármacos. Los marcadores predictivos son el estado de LOH1p/19q y la metilación del promotor MGMT.

Se dispone de diversos tratamientos que incluyen radioterapia o radiocirugía, cirugía, quimioterapia o una combinación de estas opciones, así como cuidados de apoyo, para pacientes que no responden o progresan después de la terapia inicial, pero la supervivencia es muy variable de forma individual. Los pacientes con un estado funcional adecuado que no hayan recibido terapia citotóxica previa pueden beneficiarse de la quimioterapia. Ante la recurrencia del tumor, las opciones de tratamiento incluyen atención de apoyo, reoperación, reirradiación, terapias sistémicas y terapia de modalidad combinada. Hay varias opciones disponibles para la quimioterapia de segunda línea, pero no se ha establecido ningún estándar de atención.

A pesar de las opciones terapéuticas disponibles, el glioma sigue siendo una enfermedad potencialmente mortal. Si bien la tasa de supervivencia relativa a 5 años para todos los cánceres combinados en Estados Unidos fue del 69 % entre 2008 y 2014, la tasa de supervivencia relativa a cinco años para el cáncer de cerebro y otros cánceres del sistema nervioso en el mismo período fue sólo del 35 %. El glioma de alto grado y especialmente el glioblastoma es uno de los cánceres más difíciles de tratar, con un pronóstico muy malo y una supervivencia media de solo 16 meses con el tratamiento estándar. Debido al mal pronóstico y las limitadas opciones de tratamiento para estos pacientes, se necesitan con urgencia nuevas opciones de tratamiento.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina producida por muchos tipos de células, principalmente monocitos y macrófagos activados. Se expresa como una proteína precursora transmembrana integral de 26 kDa a partir de la cual se libera mediante escisión proteolítica una proteína madura de aproximadamente 17 kDa. El TNF α

bioactivo soluble es un homotrímero que se une a los receptores de la superficie celular. Se ha demostrado que el TNF α induce necrosis de tumores sólidos. Ejerce sus efectos principalmente sobre el endotelio de la vasculatura asociada al tumor, con mayor permeabilidad, regulación positiva del factor tisular, depósito de fibrina y trombosis, y destrucción masiva de las células endoteliales.

El documento WO2001/062298, describió inmunconjugados que comprenden TNF α , fusionado al anticuerpo L19. L19 se une específicamente al dominio ED-B de la isoforma B-FN de fibronectina, que es uno de los marcadores de angiogénesis más conocidos (patente de Estados Unidos n.º 8.097.254). ED-B es un dominio adicional de 91 aminoácidos que se encuentra en la isoforma B-FN y es idéntico en ratón, rata, conejo, perro y ser humano. B-FN se acumula alrededor de estructuras neovasculares en tumores agresivos y otros tejidos sometidos a angiogénesis, tal como el endometrio en la fase proliferativa y algunas estructuras oculares en condiciones patológicas, pero por lo demás es indetectable en tejidos adultos normales. El documento de ROTH P. et al "Targeting glioblastoma with novel immunocytokines", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 38, n.º 15_suppl, 20 de mayo de 2020 (2020-05-20), páginas 2558-2558, describieron la administración del inmunconjugado L19-TNF α a modelos de glioma de ratón inmunocompetente ortotópico.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere a un inmunconjugado del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) para su uso en un método para tratar un tumor cerebral en un paciente, comprendiendo el método administrar el inmunconjugado de TNF α en combinación con quimioterapia al paciente, en donde el inmunconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) L19, en donde L19 H- y L-CDR1-3 son respectivamente las SEQIDNO:1-6, y en donde la quimioterapia es lomustina.

Se definen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

En la presente memoria descriptiva, las referencias a usos médicos, tratamientos o métodos de la invención deben interpretarse como referencias al conjugado para su uso en un método de tratamiento de un tumor cerebral en un paciente en combinación con lomustina, como se define en las reivindicaciones.

En realizaciones preferidas, el tumor cerebral es un glioma. El glioma puede ser un glioma de grado III/IV. El glioma puede ser un glioma de tipo salvaje isocitrato deshidrogenasa (IDH). En algunas realizaciones, el glioma de Grado III/IV tiene su primera recaída cuando se administra el tratamiento. En algunas realizaciones, el glioma es un glioblastoma de grado IV. Opcionalmente, el glioblastoma de grado IV puede ser diagnosticado recientemente cuando se administra el tratamiento. Opcionalmente, el glioblastoma de grado IV puede tener una primera recaída cuando se administra el tratamiento.

El inmunconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que se une a la isoforma de corte y empalme B-FN de fibronectina.

De acuerdo con la invención, el inmunconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) L19, en donde las secuencias de aminoácidos de las CDR son las expuestas en las SEQ ID NO: 1-6. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo comprende el dominio L19 VH SEQ ID NO: 7 y el dominio L19 VL SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, el inmunconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que es un Fv de cadena única (scFv), opcionalmente en donde la molécula de anticuerpo es L19 (scFv) SEQ ID NO: 10. El inmunconjugado de TNF α puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Los tratamientos desvelados en el presente documento normalmente implican la administración del inmunconjugado mediante inyección intravenosa. Como alternativa, el inmunconjugado puede administrarse mediante inyección intratumoral o intratecal.

Además de la administración de inmunconjugados, de acuerdo con la invención, el inmunconjugado se administra en combinación con lomustina y opcionalmente con radioterapia.

De acuerdo con la invención, el inmunconjugado se administra en combinación con lomustina. La lomustina se puede administrar en una dosis que esté dentro del intervalo de 50-200 mg/m² o 75-150 mg/m². La lomustina se puede administrar en una dosis de aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100 o aproximadamente 110 mg/m². Preferentemente, la lomustina se administra a una dosis de entre aproximadamente 90 y aproximadamente 110 mg/m². En algunas realizaciones, la lomustina se administra en una dosis de aproximadamente 90 mg/m². Las terapias combinadas con lomustina pueden ser particularmente útiles para tratar un glioblastoma en la primera recaída.

Cuando se administra en combinación con lomustina, L19-TNF α se puede administrar a dosis entre 5 y 20 μ g/kg,

preferentemente entre 8 y 15 µg/kg, más preferiblemente entre 10 y 13 µg/kg.

El experto entenderá que el inmunoconjugado de TNFα se puede administrar solo una vez en el contexto de los usos y tratamientos médicos de la presente invención. Como alternativa, los usos y tratamientos médicos de la presente invención pueden implicar administraciones múltiples del inmunoconjugado de TNFα. En algunas realizaciones, los usos y tratamientos médicos de la presente invención pueden implicar radioterapia y/o cirugía (cada una de las cuales puede realizarse antes, simultáneamente con o después de la administración del inmunoconjugado de TNFα en combinación con lomustina).

En algunas realizaciones, siguiendo los usos y/o tratamientos médicos de la presente invención (que implican la administración del inmunoconjugado de TNFα al paciente en combinación con lomustina), se puede observar necrosis tumoral después de la administración del inmunoconjugado de TNFα. En algunos casos, la necrosis tumoral es detectable un día después de la administración del inmunoconjugado de TNFα. Por lo tanto, los usos y métodos médicos de la invención pueden incluir opcionalmente la etapa de enviar al paciente para una evaluación de la necrosis tumoral en un momento posterior a la administración del inmunoconjugado de TNFα, por ejemplo, 1 día después, 2 días después, 3 días después, 4 días después, 5 días después, 6 días después, aproximadamente una semana después, aproximadamente 10 días después, aproximadamente dos semanas después o aproximadamente un mes después de que se administre el inmunoconjugado de TNFα. Por lo tanto, los usos y métodos médicos de la divulgación también pueden incluir tomar una decisión con respecto a una terapia adicional y, opcionalmente, realizar dicha terapia adicional, después de ver los resultados de la evaluación de necrosis tumoral. Preferentemente, se observará necrosis tumoral en uno o más de estos puntos de tiempo. El experto podrá utilizar fácilmente técnicas tales como resonancia magnética de perfusión para medir la necrosis tumoral. La resonancia magnética de perfusión puede discriminar entre áreas tumorales muertas y regiones vivas de células tumorales; esta técnica se puede aplicar al entorno clínico actual. La terapia adicional puede comprender administración adicional de los usos y/o tratamientos médicos de la presente invención. De forma adicional o alternativa, la terapia adicional puede comprender quimioterapia, radioterapia y/o cirugía.

En algunas realizaciones, siguiendo los usos y/o tratamientos médicos de la presente invención (que implican la administración del inmunoconjugado de TNFα al paciente en combinación con lomustina, como se define en las reivindicaciones), se puede observar una reducción de la perfusión sanguínea del tumor después de la administración del inmunoconjugado de TNFα. En algunos casos, se puede detectar una reducción de la perfusión sanguínea al tumor un día después de la administración del inmunoconjugado de TNFα al paciente. Por lo tanto, los usos y métodos médicos de la invención pueden incluir opcionalmente la etapa de enviar al paciente para observación de la perfusión sanguínea del tumor en un momento posterior a la administración del inmunoconjugado de TNFα, por ejemplo, 1 día después, 2 días después, 3 días después, 4 días después, 5 días después, 6 días después, aproximadamente una semana después, aproximadamente 10 días después, aproximadamente dos semanas después o aproximadamente un mes después de que se administre el inmunoconjugado de TNFα. Preferentemente, se observará una reducción de la perfusión sanguínea en uno o más de estos puntos de tiempo. Los usos y métodos médicos de la divulgación también pueden incluir la etapa posterior de tomar una decisión con respecto a una terapia adicional y, opcionalmente, realizar dicha terapia adicional, después de ver los resultados de la observación de la perfusión sanguínea del tumor. El experto en la materia podrá utilizar fácilmente técnicas tales como resonancia magnética de perfusión para realizar esta observación. La resonancia magnética de perfusión es un método común para monitorizar los tumores cerebrales; y se puede aplicar al entorno clínico actual. La terapia adicional puede comprender administración adicional de los usos y/o tratamientos médicos de la presente invención. De forma adicional o alternativa, la terapia adicional puede comprender quimioterapia, radioterapia y/o cirugía.

En algunas realizaciones de los usos y/o tratamientos médicos de la presente invención (que implican que el inmunoconjugado de TNFα se administre al paciente en combinación con lomustina, como se define en las reivindicaciones), se puede realizar una cirugía en el tumor cerebral. En algunas realizaciones, parte del tumor se ha extirpado antes de realizar el uso/método médico de la presente invención. En algunas realizaciones, parte o la totalidad del tumor se extirpará después de que se realicen los usos y/o tratamientos médicos de la presente invención.

En algunas realizaciones, siguiendo los usos y/o tratamientos médicos de la presente invención (que implican la administración del inmunoconjugado de TNFα al paciente en combinación con lomustina, como se define en las reivindicaciones), se puede observar una infiltración de linfocitos T en el tejido tumoral después de la administración del inmunoconjugado de TNFα. La detección de la infiltración de linfocitos T se puede lograr mediante inmunohistoquímica realizada en una muestra de tumor obtenida mediante cirugía. Los linfocitos T infiltrantes pueden ser linfocitos T CD4+ (los llamados "linfocitos T auxiliares") y/o linfocitos T CD8+ (los llamados "linfocitos T citotóxicos"). En algunas realizaciones de la invención, la cirugía precede y sigue a la administración del inmunoconjugado de TNFα (por ejemplo, con quimioterapia/radioterapia). En estas realizaciones, el grado de infiltración de linfocitos T antes de la administración del inmunoconjugado de TNFα se puede comparar con el grado de infiltración de linfocitos T después de la administración del inmunoconjugado de TNFα. En algunas realizaciones, el aumento de la infiltración de linfocitos T se puede observar en el recuento de linfocitos T CD4+. En algunas realizaciones, el aumento de la infiltración de linfocitos T se puede observar en el recuento de linfocitos T CD8+. El experto es capaz de utilizar fácilmente técnicas tales como inmunohistoquímica o citometría de flujo, para detectar y contar linfocitos T en una muestra. Los reactivos apropiados están ampliamente disponibles. Dichas técnicas implican el uso de anticuerpos anti-linfocitos T para teñir

los linfocitos T en una muestra de células mixtas.

Se conocen varias isoformas de corte y empalme de componentes de la matriz extracelular tumoral, y se pueden usar moléculas de anticuerpos dirigidas a cualquiera de dichas isoformas para atacar selectivamente el cáncer. Estos incluyen isoformas de corte y empalme de fibronectina, tal como B-FN. B-FN incluye un dominio ED-B adicional. Según la invención, la molécula de anticuerpo comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo L19. Estos son, como se ilustra en la **Figura 2**:

CDR 1 de VH	SFSMS	SEQ ID NO: 1
CDR 2 de VH	SISGSSGTTYADSVKG	SEQ ID NO: 2
CDR 3 de VH	PFPYFDY	SEQ ID NO: 3
CDR 1 de VL	RASQSVSSSFLA	SEQ ID NO: 4
CDR 2 de VL	YASSRAT	SEQ ID NO: 5
CDR 3 de VL	QQTGRIPPT	SEQ ID NO: 6

El inmunoconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que comprende las CDR L19. La molécula de anticuerpo en el inmunoconjugado se une al mismo componente de la matriz extracelular, la misma isoforma de corte y empalme, el mismo dominio.

Preferentemente, la molécula de anticuerpo (del inmunoconjugado de TNF α) comprende el dominio VH de L19 y/o el dominio VL de L19. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de L19 son SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9 respectivamente (**Figura 2**).

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo es un Fv de cadena sencilla (scFv) u otro fragmento de anticuerpo de bajo peso molecular y/o que carece de una región Fc. Estas propiedades ayudan a dirigir y penetrar el tejido del inmunoconjugado en el sitio del tumor. Una molécula de anticuerpo preferida es scFv-L19, que es un scFv que comprende un dominio VH de L19 y un dominio VL de L19, en donde VH y VL están unidos en una única cadena polipeptídica mediante una secuencia enlazadora peptídica. El experto apreciará que se puede utilizar una amplia gama de enlazadores tanto en el contexto de enlazar dominios VH como VL; y dentro del contexto de unir el dominio del anticuerpo al dominio TNF. El experto puede identificar fácilmente enlazadores que pueden usarse para conservar la funcionalidad de los dominios que están enlazando. El dominio VH contiene secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y el dominio VL contiene secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL. El dominio VH puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en la Figura 2 (SEQ ID NO: 7). El dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos como se expone en la Figura 2 (SEQ ID NO: 9). Los dominios VH y VL normalmente están unidos mediante un enlazador peptídico como el enlazador de 12 restos que se muestra en la **Figura 2** (SEQ ID NO: 8). Preferentemente, el scFv-L19 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la **Figura 2** (SEQ ID NO: 10).

Se puede utilizar un enlazador molecular como un péptido para unir la citocina a la molécula de anticuerpo, facilitando la expresión de todo o parte del inmunoconjugado como una proteína de fusión. Cuando la molécula de anticuerpo es también una molécula de cadena sencilla, tal como scFv, toda la cadena polipeptídica del inmunoconjugado puede producirse convenientemente como una proteína de fusión. Para el inmunoconjugado de TNF α , las proteínas de fusión luego se ensamblan en trímeros, permitiendo que el TNF α adopte su forma trimérica normal.

Opcionalmente, el inmunoconjugado lleva un marcador detectable y/o funcional, tal como un isótopo radiactivo. L19 radiomarcado y su uso en la terapia del cáncer, se ha descrito previamente (documentos WO2003/076469, WO2005/023318).

Opcionalmente, los inmunoconjugados se inyectan directamente en el sitio del cáncer, es decir, en el tumor/lesión responsable de causar el cáncer. En algunos aspectos, la aguja de inyección se inserta por vía intracraneal para acceder a la lesión.

Otros tratamientos que pueden usarse en combinación con la invención incluyen la administración de radioterapia.

De acuerdo con la invención, la lomustina se puede administrar a una dosis dentro del intervalo de 50-200 mg/m² o 75-150 mg/m². La lomustina se puede administrar en una dosis de aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100 o aproximadamente 110 mg/m². Preferentemente, la lomustina se puede administrar a 90 mg/m².

En algunos aspectos diferentes, la radioterapia se puede administrar a 20-100 Gy, preferentemente 40-80 Gy, más preferiblemente a 60 Gy. La radioterapia podrá ser fraccionada. A modo de ejemplo, la dosis puede dividirse en fracciones de aproximadamente 2 Gy. En algunas realizaciones, la radioterapia se administra a 60 Gy/30 fracciones a 2 Gy los días 1-5 de cada semana de tratamiento, durante 6 semanas de tratamiento.

Descripción de los dibujos

La **Figura 1A** muestra lesiones de glioma en dos pacientes diferentes antes y después del tratamiento con L19-TNF α . Las lesiones se reducen gradualmente después de dos y seis ciclos. La parte interna oscura de las lesiones indica el núcleo necrótico en expansión, confirmando la acción terapéutica del TNF α objetivo.

La **Figura 1B** Análisis de inmunohistoquímica antes y después del tratamiento con L19-TNF α . El aumento de linfocitos T CD4 y CD8 infiltrantes de tumores después del tratamiento confirmó la acción terapéutica del TNF α objetivo. De manera similar, el aumento de caspasa-3 indica un mayor número de células tumorales muertas.

La **Figura 2** muestra la secuencia de aminoácidos de L19(scFv) (SEQ ID NO:10). Los dominios VH y VL se muestran por separado (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9, respectivamente). Las secuencias CDR 1, 2 y 3 en los dominios VH y VL se muestran subrayadas. Los dominios VH y VL están unidos mediante una secuencia enlazadora peptídica de 12 restos (SEQ ID NO: 8).

La Figura 3 muestra imágenes de resonancia magnética de un paciente con glioblastoma al que se le administró L19-TNF de acuerdo con la invención. El panel superior (A) es la imagen de resonancia magnética inicial (de referencia), que muestra el glioblastoma indicado en el círculo blanco. El panel inferior (B) muestra una imagen de resonancia magnética tomada después del tratamiento, 40 días después de que se tomó la imagen inicial. El glioblastoma que se muestra en el panel B está indicado con una flecha y un círculo blanco. Se reduce sustancialmente.

Descripción detallada de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Una molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina ya sea natural o producida parcial o totalmente de forma sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprenda un sitio de unión a antígeno anticuerpo. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por tanto, se incluyen las proteínas de fusión que comprenden un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos es bien conocida (EP0120694, EP0125023).

Otras técnicas disponibles en la técnica de diseño de anticuerpos mediante ingeniería genética han posibilitado aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, los hibridomas humanos pueden prepararse como se ha descrito anteriormente. La presentación en fagos es otra técnica establecida (documento WO92/01047). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos de ratón se han inactivado y sustituido funcionalmente con genes de anticuerpos humanos, dejando intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón se pueden usar para aislar anticuerpos humanos.

Se pueden crear moléculas de anticuerpos sintéticos mediante su expresión a partir de genes generados mediante oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Se prefieren los fragmentos de anticuerpos en los conjugados de la invención debido a su pequeño tamaño y su interacción mínima con otras moléculas y receptores (por ejemplo, el receptor Fc). Particularmente preferidas son las moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos mediante un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno. El scFv puede estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL.

Otro pequeño fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un dAb (anticuerpo de dominio), es decir, la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Los dAb de VH se producen naturalmente en los camélidos (por ejemplo, camellos, llamas) y pueden producirse inmunizando un camélido con un antígeno diana, aislando linfocitos B específicos de antígeno y clonando directamente genes de dAb de linfocitos B individuales. Los dAb también se pueden producir en cultivos celulares. Su pequeño tamaño, la buena solubilidad y la estabilidad de la temperatura los hacen particularmente útiles fisiológicamente y adecuados para la selección y la maduración por afinidad.

Un sitio de unión a antígeno es la parte de una molécula que se une específicamente y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo, se denomina sitio de unión al antígeno del anticuerpo y comprende la parte del anticuerpo que se une específicamente y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina epítopo. Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de anticuerpo. Preferentemente, un sitio de unión a antígeno del anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

El término "específico" se puede usar para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) miembro(s) de unión específica. El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que es transportado por varios antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que porta el sitio de unión al antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que portan el epítipo.

En inmunoconjugados para su uso en la invención, la molécula de anticuerpo se une a un componente de la matriz extracelular que es un marcador del crecimiento tumoral. La matriz extracelular (MEC) se remodela durante el crecimiento del tumor y se pueden expresar selectivamente variantes de empalme alternativas de los componentes de la MEC en el sitio de la lesión.

Un ejemplo es la fibronectina. Por ejemplo, la isoforma B-FN de fibronectina contiene un dominio adicional ED-B. En inmunoconjugados para uso en la invención, la molécula de anticuerpo se une específicamente a ED-B de la isoforma B-FN de fibronectina. La molécula de anticuerpo comprende las CDR L19. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede ser un scFv que tiene un dominio VH con una secuencia de aminoácidos que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y/o CDR3 de VH de L19, y un dominio VL con una secuencia de aminoácidos que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL de L19. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio VH de L19 como se establece en SEQ ID NO: 7, y/o comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del dominio VL de L19 como se establece en SEQ ID NO: 9. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo es un scFv(L19) que comprende un dominio VH de L19 (SEQ ID NO: 7) y un dominio VL de L19 (SEQ ID NO: 9). En una realización preferida, la molécula de anticuerpo es L19(scFv) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 (Figura 2).

Se pueden emplear formas modificadas del dominio VH y/o VL de L19 en inmunoconjugados de la invención, por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede comprender el dominio L19 VH o L19 VL en el que se han realizado 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos en una CDR y/o región estructural, manteniendo la unión específica a la fibronectina ED-B. Tales sustituciones de aminoácidos son preferiblemente conservadoras, por ejemplo, sustitución de un resto hidrofóbico por otro, un resto polar por otro, arginina por lisina, glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los inmunoconjugados y partes de los mismos también forman parte de la divulgación. La molécula de ácido nucleico puede ser un vector, por ejemplo, un plásmido adecuado para la expresión de la secuencia de nucleótidos. Normalmente, la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a un elemento regulador tal como un promotor de la transcripción.

Las moléculas de ácido nucleico pueden estar contenidas en una célula huésped, que puede ser una célula cotransfectada con las moléculas de ácido nucleico o una hija de dicha célula. Las células, especialmente células eucariotas, por ejemplo células HEK y CHO, o células bacterianas, por ejemplo, Escherichia coli, que contienen las moléculas de ácido nucleico también forman parte de la divulgación.

Los inmunoconjugados para su uso en la invención pueden producirse mediante técnicas recombinantes, por ejemplo expresando todo o parte del inmunoconjugado como una proteína de fusión. Normalmente la expresión se realiza en una célula huésped que contiene ácido nucleico, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la expresión puede comprender cultivar dicha célula huésped. Para las proteínas de fusión de TNF α , la trimerización de las subunidades puede ocurrir en la célula o durante la purificación de las proteínas de fusión de la célula.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se conjuga con la citocina mediante un enlace peptídico, por ejemplo, dentro de una proteína de fusión que comprende el TNF α y la molécula de anticuerpo o una cadena polipeptídica de la misma. Véase el documento WO2001/062298. Un ejemplo de un enlazador adecuado se establece en la SEQ ID NO: 12.

El TNF α usado en inmunoconjugados para su uso en la invención es preferiblemente TNF α humano. El TNF α humano preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 11. Las moléculas de anticuerpo son preferentemente moléculas de anticuerpo humanas o humanizadas. El conjugado L19-huTNF α puede comprender o consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13.

También se describe un método que comprende formular el inmunoconjugado o inmunoconjugados en una composición farmacéutica. En general, esto implica purificar el inmunoconjugado o inmunoconjugados y combinarlo con un vehículo fisiológicamente aceptable.

Los inmunoconjugados y composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del principio activo (inmunoconjugado), un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizador farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos materiales no

deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. Para inyección en el sitio del tumor, el inmunoconjugado puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable sin pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados.

Los usos y métodos terapéuticos descritos en el presente documento se pueden aplicar a diferentes tipos de tumores cerebrales. El tumor puede ser cualquier proliferación celular no deseada (o cualquier enfermedad que se manifieste por proliferación celular no deseada), neoplasia o tumor. A modo de ejemplo, el tumor cerebral podría ser una neoplasia maligna primaria del cerebro, una neoplasia maligna secundaria del cerebro, una neoplasia maligna secundaria del cerebro y las meninges cerebrales, una neoplasia benigna del cerebro y del sistema nervioso central o una neoplasia de comportamiento incierto del cerebro. La neoplasia puede ser un glioma.

El inmunoconjugado de TNF α para su uso según la invención se administra en combinación con lomustina.

Algunas realizaciones de la presente invención implican el uso del inmunoconjugado de TNF formulado como una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir un "excipiente" farmacéuticamente aceptable compuesto por materiales que se consideran seguros y eficaces. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que "generalmente se consideran seguras", por ejemplo, que son fisiológicamente tolerables y no suelen producir una reacción adversa alérgica o similar, tales como malestar gástrico y similares, cuando se administran a un ser humano. Los excipientes pueden incluir disolventes, potenciadores de la solubilidad, agentes de suspensión, agentes tamponantes, agentes isotónicos, antioxidantes o conservantes antimicrobianos. Ciertas composiciones de L19-TNF α se describen en el documento WO2018/011404.

Cabe señalar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el" o "la", incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. En el presente documento, los intervalos se pueden expresar como desde "aproximadamente" un valor concreto y/o hasta "aproximadamente" otro valor concreto. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular constituye otra realización. El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico es opcional y significa, por ejemplo, +/- 10 %.

La divulgación se ha proporcionado con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para mayor claridad de comprensión. En consecuencia, no debe interpretarse que la descripción y los ejemplos limitan la invención, que se define en las reivindicaciones.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Efecto de L19-TNF α sobre el tumor cerebral

Tres pacientes con glioblastoma recurrente fueron tratados con L19-TNF α a una dosis de 10 μ g/kg. Ya veinticuatro horas después de la infusión, se detectó una disminución en la perfusión tumoral general y una necrosis tumoral emergente, como se muestra en la **Figura 1A**. Un paciente tuvo enfermedad progresiva después de tres meses y dos pacientes todavía tienen enfermedad estable con un área creciente de necrosis en la región del tumor seis meses después del tratamiento. Esto es sorprendente teniendo en cuenta que la supervivencia libre de progresión (SLP) para el glioblastoma recurrente es de 1,5 meses.

El paciente con enfermedad progresiva fue sometido a resección y el tejido de esta cirugía, es decir, después del tratamiento con L19-TNF α , se comparó con el tejido obtenido durante la primera cirugía. Mediante inmunohistoquímica se detectó un aumento significativo de linfocitos T CD4 y CD8 infiltrantes de tumor en el tumor después del tratamiento con L19-TNF α . De manera adicional, se encontraron niveles elevados de caspasa-3 escindida, lo que sugiere un mayor número de células tumorales muertas, como se muestra en la **Figura 1B**. Estos datos demuestran la activación *in situ* debido a la administración dirigida de TNF.

Ejemplo 2 - Efecto de L19-TNF α con quimioterapia sobre el tumor cerebral

Este ejemplo describe el efecto de una terapia combinada en un paciente con glioblastoma recurrente después de quimiorradioterapia seguida de terapia de mantenimiento con temozolomida.

Un paciente de sexo masculino de 61 años con glioblastoma (grado IV de la OMS) en su primera recurrencia, recibió 90 mg/m² de lomustina (CCNU) el día 1. Además, este paciente recibió 13 μ g/kg de L19-TNF, mediante infusión i.v., los días 1, 3, 5, 22, 24 y 26.

El paciente había sido pretratado por glioblastoma recién diagnosticado con resección y quimiorradioterapia seguida de terapia de mantenimiento con temozolomida.

Inicialmente se realizó una resonancia magnética con contraste, antes de recibir lomustina y L19-TNF (imagen inicial; véase la Figura 3A) y 40 días después de la imagen inicial (Figura 3B). El tumor se redujo sustancialmente.

5 Listado de secuencias

Secuencias de aminoácidos de las CDR de L19

CDR1 de L19 VH-SFSMS	(SEQ ID NO: 1)
CDR2 de L19 VH -SISGSSGTTYADSVKG	(SEQ ID NO: 2)
CDR3 de L19 VH-PFPYFDY	(SEQ ID NO: 3)
CDR1 de L19 VL -RASQSVSSSFLA	(SEQ ID NO: 4)
CDR2 de L19 VL -YASSRAT	(SEQ ID NO: 5)
CDR3 de L19 VL-QQTGRIPPT	(SEQ ID NO: 6)

10 Secuencia de aminoácidos del dominio VH de L19 (SEQ ID NO: 7)

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWSSISGSSGTTYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos del enlazador entre VH y VL (SEQ ID NO: 8)

15 GDGSSGGSGGAS

Secuencia de aminoácidos del dominio VL de L19 (SEQ ID NO: 9)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFS
GSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

20 Secuencia de aminoácidos del scFv de L19 (SEQ ID NO: 10)

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWSSISGSSGTTYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos de la forma soluble del dominio extracelular del TNFα humano (huTNFα) (SEQ ID NO: 11).

25 VRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVL
FKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEK
GDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

Secuencia de aminoácidos del enlazador entre scFv y TNF (SEQ ID NO: 12)

EFSSSSGSSSSGSSSSG

30 Secuencia de aminoácidos del conjugado L19-huTNF (SEQ ID NO: 13)

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWSSISGSSGTTYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTVSSGDGSSGGSGGASEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKEFSSSSGSSSSGSSSSGVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado de TNF α para su uso en un método de tratamiento de un tumor cerebral en un paciente, comprendiendo el método administrar el inmunoconjugado de TNF α en combinación con quimioterapia al paciente, en donde el inmunoconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) L19, en donde las CDR de L19 son:
- | | | |
|-------------|------------------|--------------|
| CDR 1 de VH | SFSMS | SEQ ID NO: 1 |
| CDR 2 de VH | SISGSSGTTYADSVKG | SEQ ID NO: 2 |
| CDR 3 de VH | PFPYFDY | SEQ ID NO: 3 |
| CDR 1 de VL | RASQSVSSSFLA | SEQ ID NO: 4 |
| CDR 2 de VL | YASSRAT | SEQ ID NO: 5 |
| CDR 3 de VL | QQTGRIPPT | SEQ ID NO: 6 |
- en donde la quimioterapia es lomustina.
2. El inmunoconjugado de TNF α para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tumor cerebral es un glioma.
3. El inmunoconjugado de TNF α para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH de L19 SEQ ID NO: 7 y el dominio VL de L19 de SEQ ID NO: 9.
4. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inmunoconjugado de TNF α comprende TNF α unido a scFv L19 como se expone en la SEQ ID NO:10.
5. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inmunoconjugado de TNF α tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13.
6. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inmunoconjugado se administra mediante inyección intravenosa.
7. El inmunoconjugado de TNF α para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el inmunoconjugado se administra mediante inyección intratumoral o inyección intratecal.
8. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tumor cerebral es un glioma de grado III/IV.
9. El inmunoconjugado de TNF α para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el glioma es de tipo salvaje isocitrato deshidrogenasa (IDH).
10. El inmunoconjugado de TNF α para su uso según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el glioma de Grado III/IV tiene su primera recaída.
11. El inmunoconjugado de TNF α para su uso según la reivindicación 8 o la reivindicación 10, en donde el glioma es un glioblastoma de grado IV, que está recién diagnosticado.
12. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el glioma es un glioblastoma de grado IV en la primera recaída.
13. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inmunoconjugado se administra en combinación con radioterapia.
14. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde lomustina se administra a una dosis que está dentro del intervalo de 50-200 mg/m² o 75-150 mg/m².
15. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la lomustina se administra a una dosis de 80, 90, 100 o 110 mg/m².
16. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la lomustina se administra a 90 mg/m².

17. El inmunoconjugado de TNF α para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende administraciones posteriores del inmunoconjugado de TNF α .

Figura 1A

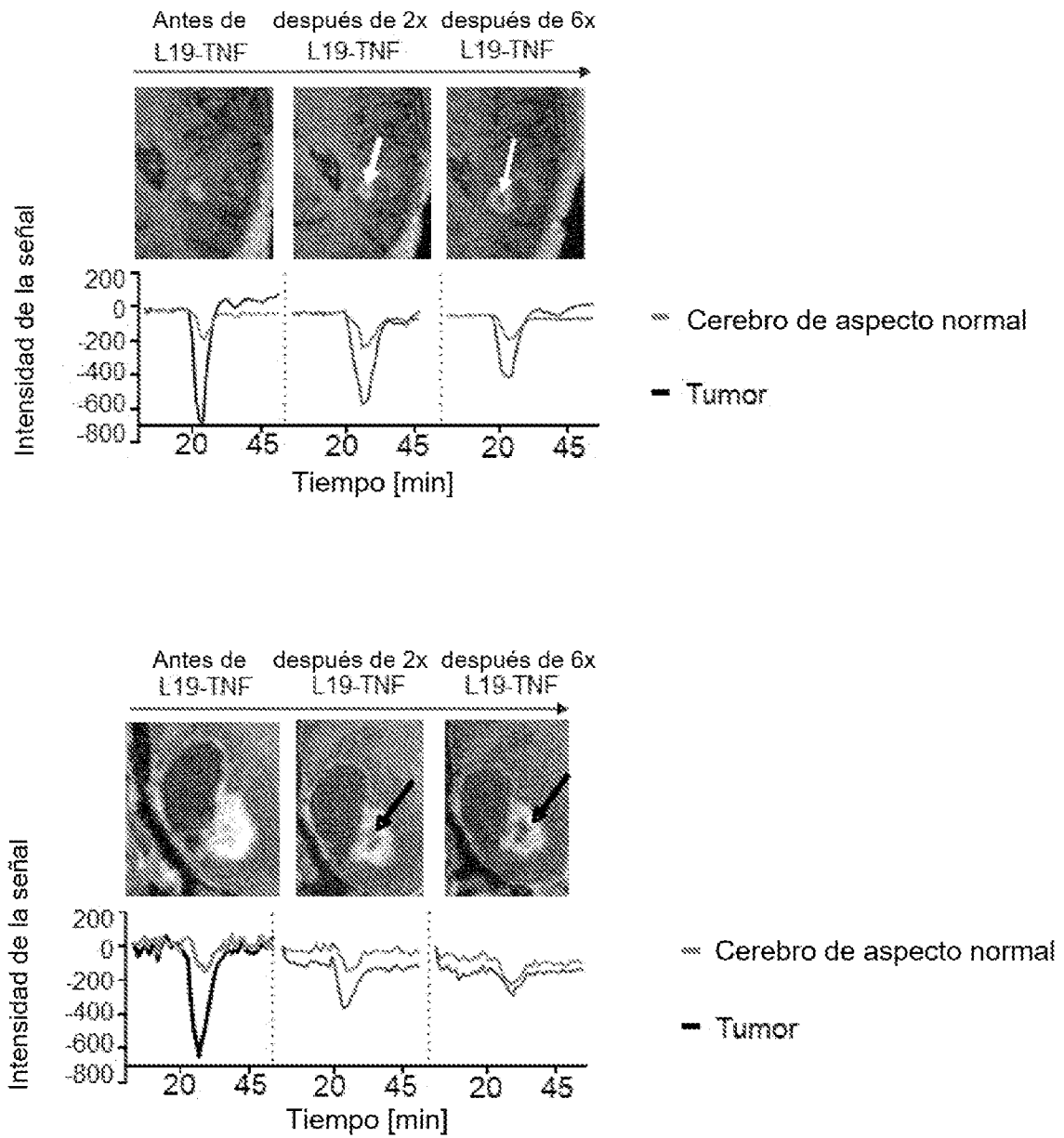


Figura 1B

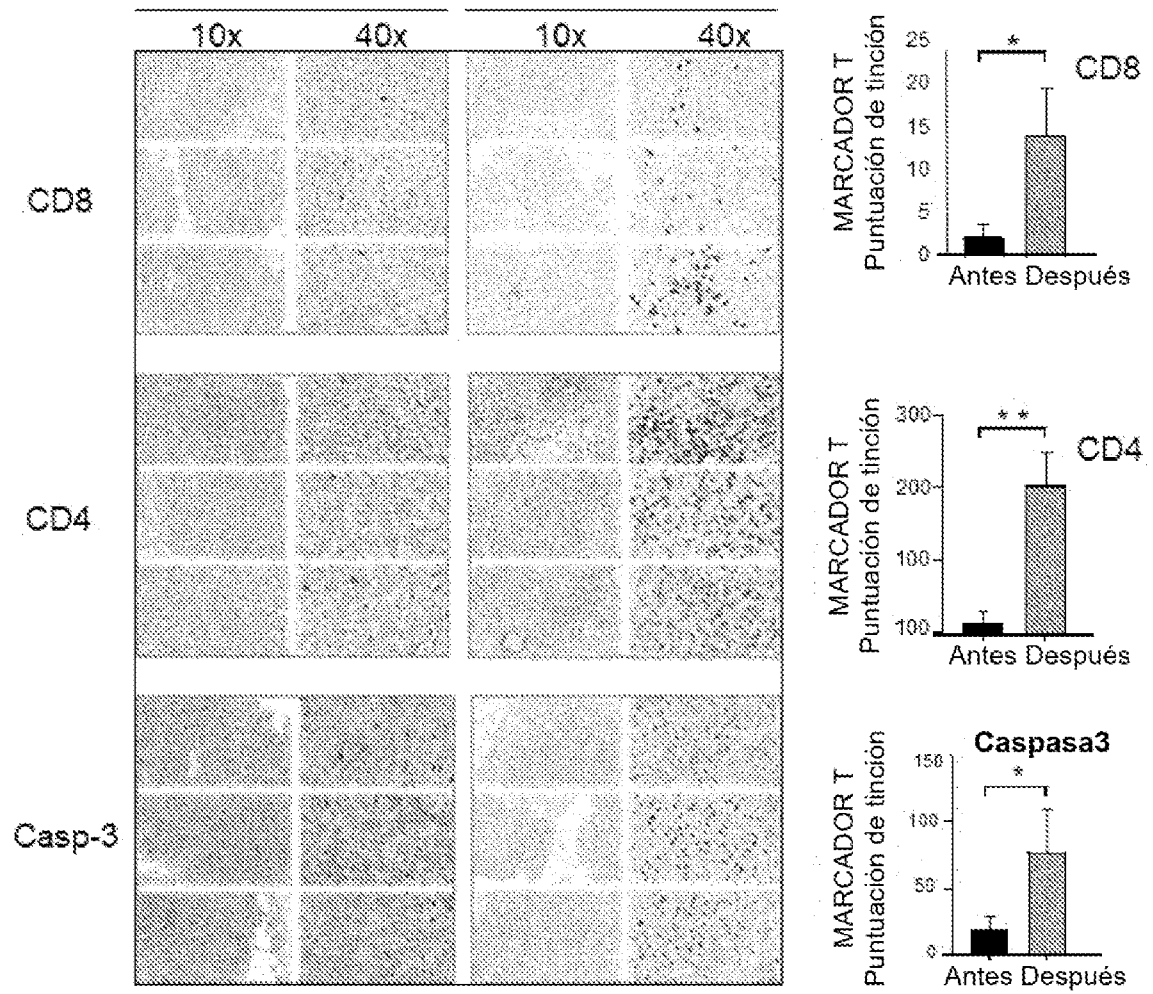


Figura 2

VH (SEQ ID NO: 7)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWSSISGSS

GTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**CDR3**
PFPHYFDYWGQGT

LVTVSS

ENLAZADOR (SEQ ID NO: 8)

GDGSSGGSGGAS

VL (SEQ ID NO: 9)

EIVLTQSPGTL^{SL}SPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSR**CDR2**

ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC**CDR3**
QQTGRIPPTFGQGTKVEIK

Figura 3

