



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 530**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03775680 .6**

96 Fecha de presentación : **05.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1562620**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Citocinas modificadas para su utilización en la terapia del cáncer.**

30 Prioridad: **05.11.2002 US 287811**
30.04.2003 US 426019

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2009

73 Titular/es: **FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE
DEL MONTE TABOR**
Via Olgettina, 60
20132 Milano, IT

72 Inventor/es: **Corti, Angelo**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 326 530 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

Citocinas modificadas para su utilización en la terapia del cáncer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a citocinas modificadas para su utilización en el tratamiento del cáncer. Más particularmente, la invención se refiere a derivados de citocinas capaces de “albergar” vasos tumorales y células presentadoras de antígenos. La presente invención se refiere asimismo a combinaciones sinérgicas que comprenden una citocina modificada.

10 **Antecedentes de la invención**

La actividad antitumoral de algunas citocinas es bien conocida y se ha descrito. Algunas citocinas se han utilizado ya terapéuticamente también en seres humanos (29). Por ejemplo, citocinas tales como la interleucina-2 (IL-2) y el interferón α (IFN α) han demostrado actividad antitumoral positiva en pacientes con diferentes tipos de tumores, tales como el carcinoma renal metastásico, la tricoleucemia, el sarcoma de Kaposi, el melanoma, el melanoma múltiple y similares. Otras citocinas como IFN β , el factor α de la necrosis tumoral (TNF), TNF β , IL-1, 4, 6, 12, 15 y los factores de estimulación de colonias (CFS) han demostrado una cierta actividad antitumoral en algunos tipos de tumores y por consiguiente son objeto de estudios adicionales.

En general, la utilización terapéutica de citocinas está muy limitada por su toxicidad generalizada. El TNF, por ejemplo, fue originalmente descubierto por su capacidad de provocar la necrosis hemorrágica de algunos tumores (1) y por su efecto citotóxico *in vitro* en diferentes estirpes tumorales (2), pero esto demostró posteriormente que tiene actividad proinflamatoria fuerte, que puede, en caso de condiciones de sobreproducción, afectar peligrosamente al cuerpo humano (3).

Ya que la toxicidad generalizada es un problema fundamental en la utilización de cantidades farmacológicamente activas de citocinas en los seres humanos, los nuevos derivados y las estrategias terapéuticas están actualmente en evaluación, con la intención de reducir los efectos tóxicos de esta clase de efectores biológicos conservando su eficacia terapéutica.

Algunas nuevas estrategias se refieren a:

- 35 a) el desarrollo de proteínas de fusión que pueden liberar TNF en el tumor y aumentar la concentración local. Por ejemplo, las proteínas de fusión constituidas por TNF y los anticuerpos específicos para el tumor se han producido (4);
- 40 b) el desarrollo de mutantes de TNF que mantienen la actividad antitumoral y tienen una toxicidad generalizada reducida. Por consiguiente, mutantes capaces de reconocer selectivamente solamente un receptor (p55 o p75) se han preparado ya (5);
- 45 c) la utilización de anticuerpos anti-TNF capaces de reducir algunos efectos tóxicos de TNF sin comprometer su actividad antitumoral. Dichos anticuerpos se han descrito ya en la bibliografía (30);
- d) la utilización de derivados de TNF con una vida media mayor (por ejemplo conjugados de TNF con polietilenglicol).

La preparación de derivados del TNF capaces de dirigirse selectivamente a las zonas tumorales se ha descrito recientemente. Por ejemplo, se ha descrito una proteína de fusión, obtenida fusionando el gen de la cadena pesada de un mAb receptor de anti-transferrina y el gen del TNF (4), o una proteína de fusión del TNF con la zona “bisagra” de un anticuerpo monoclonal contra el antígeno TAG72 asociado al tumor (6) o una proteína de fusión Fv-TNF (6).

El documento EP 251 494 describe un sistema para administrar un agente para diagnóstico o terapéutico, que comprende: un anticuerpo conjugado con avidina o estreptavidina, un agente capaz de acomplejar el anticuerpo conjugado y un compuesto constituido por el agente para diagnóstico o terapéutico conjugado con biotina, que se administran sucesivamente y están retardados de manera adecuada, a fin de permitir la localización del agente terapéutico o para diagnóstico mediante la interacción biotina-estreptavidina en la célula diana reconocida por el anticuerpo. Los agentes terapéuticos o para diagnóstico descritos comprenden quelatos metálicos, en particular quelatos de radionúclidos y agentes antitumorales de bajo peso molecular tales como cis-platino, doxorubicina, etc.

El documento EP 496 074 da a conocer un procedimiento que proporciona la administración sucesiva de un anticuerpo biotinilado, avidina o estreptavidina y un agente biotinilado para diagnóstico o terapéutico. Aunque los agentes citotóxicos como el ricino se mencionan genéricamente, la aplicación relativa a los compuestos radiomarcados está descrita en su mayor parte.

El documento WO 95/15979 da a conocer un procedimiento para localizar agentes muy tóxicos en las dianas celulares, basado en la administración de un primer conjugado que comprende la molécula diana específica conjugada

con un ligando o un anti-ligando seguido de la administración de un segundo conjugado constituido por el agente tóxico unido a un anti-ligando o al ligando.

5 El documento WO98/10795 da a conocer unas moléculas que alojan un tumor que comprenden los péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos NGR. No se describe ninguna utilización del péptido para dirigir una citocina a un tumor.

10 El documento WO 99/13329 dan a conocer un procedimiento para dirigir una molécula a los vasos angiogénicos tumorales, basado en la conjugación de dicha molécula con ligandos de receptores de NGR. Se han sugerido numerosas moléculas como posibles candidatos, pero solamente la doxorubicina está descrita específicamente. No se da a conocer ninguna utilización de ligandos de receptores de NGR como vehículos de citocinas para provocar respuestas inmunitarias.

15 El documento WO01/61017 da a conocer un producto de conjugación entre una citocina seleccionada de entre TNF o IFN γ y un ligando del receptor CD13.

Sumario de la invención

20 Se ha descubierto actualmente de manera sorprendente que el TNF acoplado con un ligando del receptor CD13 e IFN γ actúan de manera sinérgica de manera que puede apreciarse la actividad antitumoral eficaz bajo coadministración a dosis que son inferiores a las dosis eficaces individualmente. Además, se ha descubierto que la actividad antitumoral de una combinación del TNF modificado y otro agente antitumoral, tal como la doxorubicina, es aumentada mediante la administración de IFN γ .

25 Exposición de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un producto de conjugación de TNF y un ligando del receptor CD13, y una cantidad eficaz de IFN γ .

30 Descripción detallada de la invención

Se describirán a continuación varias características y formas de realización preferidas de la presente invención a título de ejemplo no limitativo.

35 La CD13 es una glucoproteína transmembranaria de 150 kDa muy conservada en varias especies. Se expresa en las células normales así como en las estirpes tumorales mieloides, en el endotelio angiogénico y en algunos epitelios. El receptor CD13 se identifica normalmente como receptor "NGR". Los ligandos pueden ser naturales o sintéticos. El término "ligando" hace asimismo referencia a un ligando modificado químicamente. Los uno o más dominios de unión del ligando pueden, por ejemplo, estar constituidos por un ligando natural para el receptor, o un fragmento de un
40 ligando natural que retiene la afinidad de unión para el receptor. Los ligandos sintéticos comprenden los ligandos de diseño. Como es utilizado en la presente memoria, el término "ligandos de diseño" hace referencia a los agentes que resulta probable que se unan al receptor sobre la base de su forma tridimensional en comparación con la del receptor.

45 El ligando es un un péptido lineal o cíclico que comprende el motivo NGR, tales como CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cicloGVLNGRMEC o cicloCNGRC, o, más preferentemente, el péptido CNGRC. Dichos ligandos son descritos en el documento WO98/10795 que se incorpora a la presente memoria como referencia. Los procedimientos de identificación de los ligandos del receptor CD13 se dan a conocer en el documento WO99/13329 que se incorpora a la presente memoria como referencia.

50 El término "péptido" como es utilizado en la presente memoria comprende polipéptidos y proteínas. El término "polipéptido" comprende moléculas de polipéptido de cadena sencilla así como unos complejos multipolipeptídicos en los que los polipéptidos constituyentes individuales están unidos por medios covalentes o no covalentes. El término "polipéptido" comprende péptidos de dos o más aminoácidos de longitud, presentando típicamente más de 5, 10 ó 20 aminoácidos.

55 Debe apreciarse que las secuencias polipeptídicas de utilización en la invención no están limitadas a las secuencias particulares o sus fragmentos sino que comprenden asimismo las secuencias homólogas obtenidas a partir de cualquier fuente, por ejemplo proteínas víricas/bacterianas, homólogos celulares y péptidos sintéticos relacionados.

60 Las secuencias polipeptídicas de la presente invención comprenden asimismo los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la presente invención.

Las secuencias pueden ser modificadas para su utilización en la presente invención. Típicamente, se realizan modificaciones que mantienen la actividad de la secuencia. Por lo tanto, en una forma de realización, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones con la condición de que la secuencia modificada retenga por lo menos de aproximadamente 25 a 50% de, o sustancialmente la misma actividad. Sin embargo, en una forma de realización alternativa, pueden realizarse de manera intencionada modificaciones de las secuencias de aminoácidos de un polipéptido de la invención para reducir la actividad biológica del polipéptido. Por

ES 2 326 530 T3

ejemplo, pueden resultar útiles los polipéptidos truncados que permanecen con la capacidad de unirse a la molécula diana pero que carecen de dominios efectores funcionales.

Generalmente, preferentemente menos de 20%, 10% o 5% de los residuos de aminoácidos de un variante o derivado están alterados en comparación con la región correspondiente representada en los listados de secuencia.

Las sustituciones de aminoácidos pueden comprender la utilización de los análogos que se producen de manera no natural, por ejemplo para aumentar la vida media del plasma en sangre de un polipéptido administrado terapéuticamente (ver a continuación para más detalles sobre la producción de los derivados peptídicos para su utilización en la terapia).

Pueden introducirse sustituciones conservadoras, por ejemplo según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden ser sustituidos por mutuamente:

ALIFÁTICO	No polar	GAP
		ILV
	Polar – no cargado	CSTM
		NQ
	Polar - cargado	DE
		KR
AROMÁTICO		HFVY

Los polipéptidos de la invención comprenden asimismo fragmentos de los polipéptidos mencionados anteriormente y sus variantes, comprendiendo los fragmentos de las secuencias. Los fragmentos preferidos comprenden los que incluyen un epítipo o dominio de unión. Los fragmentos adecuados serán por lo menos aproximadamente 5, por ejemplo 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos de longitud. Pueden ser asimismo inferiores a 200, 100 ó 50 aminoácidos en longitud. Los fragmentos polipeptídicos de las proteínas y sus variantes alélicas y de especie pueden contener una o más (por ejemplo 2, 3, 5, o 10) sustituciones, deleciones o inserciones, que comprenden las sustituciones conservadas. Cuando se han realizado las sustituciones, deleciones y/o inserciones, por ejemplo mediante tecnología recombinante, preferentemente menos de 20%, 10% o 5% de los residuos de aminoácidos representados en los listados de secuencias son modificados.

Los polipéptidos y los conjugados de la invención son típicamente realizados por medios recombinantes, por ejemplo como se describe a continuación. Sin embargo pueden estar realizados por medios sintéticos utilizando técnicas que resultan bien conocidas por los expertos en la materia tales como la síntesis de fase sólida. Son examinadas diversas técnicas para la síntesis química de péptidos por Borgia y Fields, 2000, Tib Tech 18: 243-251 y descritas en detalle en las referencias contenidas.

El péptido puede acoplarse directamente a la citocina o indirectamente mediante un espaciador, que puede ser un solo aminoácido, una secuencia de aminoácidos o un resto orgánico, tal como 6-aminocapril-N-hidroxisuccinimida. Los procedimientos de acoplamiento son conocidos por los expertos en la materia y comprenden técnicas de ingeniería genética o de síntesis química.

El ligando peptídico preferentemente está unido al terminal N de la citocina minimizando de este modo cualquier interferencia en la unión de la citocina modificada a su receptor. Alternativamente, el péptido puede estar unido a restos de aminoácido que son receptores de enlaces amido o carboxílico, que se producen de forma natural en la molécula o artificialmente insertados con técnicas de ingeniería genética. La citocina modificada se prepara preferentemente mediante la utilización de un ADNc que comprende una secuencia 5' contigua que codifica el péptido.

Según las reivindicaciones, se proporciona un producto de conjugación entre TNF y la secuencia CNGRC. Más preferentemente, el terminal amino de TNF está unido al péptido CNGRC mediante el espaciador G (glicina).

El producto resultante (NGR-TNF), demostró ser más activo que el TNF en modelos animales de linfoma RMA-T. Además, los animales tratados con NGR-TNF fueron capaces de rechazar más dosis tumorígenas de células RMA-T o RMA. El aumento de la actividad antitumoral, en comparación con el TNF normal, pudo observarse en animales inmunocompetitivos pero no en animales inmunodeficientes. Esto indica que el aumento en la actividad antitumoral de TNF conjugado con péptidos "NGR" es debido a un aumento de la respuesta inmunitaria en lugar de a una actividad citotóxica directa del conjugado.

ES 2 326 530 T3

Se ha demostrado también que los efectos inmunitarios *in vivo* provocados por NGR-TNF están relacionados directamente con el receptor CD13. Se ha observado, por ejemplo, que el anticuerpo contra el receptor CD13 así como el ligando GNGRC compiten con NGR-TNF *in vivo*, sugiriendo de este modo un mecanismo de dirección del receptor por NGR-TNF.

5

El índice terapéutico de los conjugados del ligando TNF/CD13 puede mejorarse más utilizando una forma mutante de TNF capaz de unirse selectivamente a uno de los dos receptores de TNF, p75TNFR y p55TNFR. Dicho mutante de TNF puede obtenerse por mutagénesis dirigida a la zona (5; 7).

10 El índice farmacocinético de las citocinas modificadas según la invención puede mejorarse preparando derivados de polietilenglicol, que permiten ampliar la vida media plasmática de las propias citocinas.

Una forma de realización adicional de la invención es proporcionada por derivados bifuncionales en los que las citocinas modificadas con el ligando CD13 están conjugadas con anticuerpos, o sus fragmentos, contra los antígenos tumorales u otros marcadores angiogénicos tumorales, p. ej., integrinas αv , metaloproteasas o el factor de crecimiento vascular, o anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos contra los componentes de la matriz extracelular, tales como los anticuerpos anti-tenascina o el dominio EDB de la anti-fibronectina. Se ha descrito recientemente la preparación de un producto de fusión entre TNF y la zona bisagra de un mAb contra el antígeno TAG72 asociado al tumor expresado por el adenocarcinoma gástrico y de ovario (6).

20

Una forma de realización adicional de la invención es proporcionada por el predireccionamiento tumoral con el sistema biotina/avidina. Según esta estrategia, se obtiene un complejo ternario en la zona antigénica tumoral, en diferentes etapas, que está formada por 1) mAb biotinilado, 2) avidina (o estreptavidina) y 3) citocina bivalente modificada con el ligando CD13 y biotina. Numerosos artículos demostraron que la estrategia de predireccionamiento, en comparación con el direccionamiento convencional con inmunoconjugados, puede aumentar realmente la relación de molécula activa contenida en la diana a molécula activa libre, reduciendo de este modo la toxicidad del tratamiento (11, 10, 9, 8). Esta estrategia produjo resultados favorables con el TNF biotinilado, que fue capaz de provocar citotoxicidad *in vitro* y disminuir el crecimiento de las células tumorales en condiciones en las que el TNF normal era inactivo (14, 26). La estrategia de predireccionamiento puede realizarse también con un procedimiento en dos fases utilizando un anticuerpo biespecífico que al mismo tiempo se une al antígeno tumoral y a la citocina modificada. La utilización de un anticuerpo biespecífico dirigido contra el antígeno carcinoembrionario y el TNF se ha descrito recientemente como un medio para el predireccionamiento tumoral del TNF (31).

30

Según una forma de realización adicional, la invención comprende una molécula de TNF conjugada tanto con un ligando CD13 como con un anticuerpo, o un fragmento de la misma (directa o indirectamente mediante un puente biotina-avidina), en diferentes subunidades de TNF, donde el anticuerpo o sus fragmentos están dirigidos contra un anticuerpo expresado en las células tumorales u otros componentes del estroma tumoral, p. ej. el dominio EDB de tenascina y fibronectina. Esto da como resultado una mejora adicional del tumor que alberga las propiedades de la citocina modificada y en la liberación lenta de este último en el microambiente tumoral mediante las transiciones trímero-monómero-trímero. Como se demuestra en los trabajos anteriores, de hecho, las subunidades modificadas de los conjugados de TNF pueden disociarse de los complejos de direccionamiento y reasociarse con el fin de formar moléculas de TNF triméricas inalteradas, que a continuación se difunden en el microentorno del tumor. Se ha demostrado que la liberación del TNF bioactivo se produce entre las 24 y 48 horas después del direccionamiento (21).

40

Los péptidos de la presente invención pueden ser administrados terapéuticamente a los pacientes. Resulta preferido utilizar los péptidos que no están únicamente constituidos por aminoácidos que se producen naturalmente sino que han sido modificados, por ejemplo para reducir la inmunogenicidad, para aumentar la vida media circulatoria en el cuerpo del paciente, para mejorar la biodisponibilidad y/o para mejorar la eficacia y/o la especificidad.

45

Han sido utilizados diversos enfoques para modificar los péptidos para su aplicación terapéutica. Un enfoque consiste en unir los péptidos o las proteínas a una variedad de polímeros, tales como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG) -ver por ejemplo las patentes US n° 5.091.176, 5.214.131 y US n° 5.264.209.

50

Se puede utilizar la sustitución de los aminoácidos que se producen naturalmente con una variedad de aminoácidos modificados o no codificados tales como los D-aminoácidos y los N-metil aminoácidos para modificar los péptidos.

55

Otro enfoque consiste en utilizar agentes de reticulación bifuncionales, tales como N-succinimidil 3-(2 piridilditio) propionato, succinimidil 6-[3-(2 piridilditio) propionamido] hexanoato, y sulfosuccinimidil 6-[3-(2-piridilditio) propionamido] hexanoato (ver la patente US n° 5.580.853).

60

Puede resultar deseable utilizar los derivados de los péptidos de la invención que están limitados en su conformación. La limitación en su conformación hace referencia a la conformación preferida y la estabilidad de la forma tridimensional adoptada por un péptido. Las limitaciones en la conformación comprenden las limitaciones locales, que implican limitar la movilidad en la conformación de un residuo sencillo de un péptido; limitaciones regionales, que implican limitar la movilidad en la conformación de un grupo de residuos, pudiendo dichos residuos formar alguna unidad estructural secundaria; y limitaciones globales, que implican la estructura del péptido total.

65

La conformación activa del péptido puede ser estabilizada mediante una modificación covalente, tal como la ciclación o mediante la incorporación de gamma-lactamo u otros tipos de puentes. Por ejemplo, las cadenas laterales se pueden someter a ciclación para el esqueleto de manera que se creen una porción de L-gamma-lactamo en cada lado del sitio de interacción. Ver, en general, Hrubby *et al.*, "Applications of Synthetic Peptides", en *Synthetic Peptides: A User's Guide*: 259-345 (W. H. Freeman & Co. 1992). Se puede asimismo conseguir la ciclación, por ejemplo, mediante la formación de puentes de cisteína, acoplando los grupos terminales carboxi y amino de los aminoácidos terminales respectivos, o acoplando el grupo amino de un residuo Lys o un homólogo relacionado con un grupo carboxi de Asp, Glu o un homólogo relacionado. Se puede asimismo realizar el acoplamiento del grupo alfa-amino de un polipéptido con el grupo épsilon-amino de un residuo de lisina utilizando anhídrido yodoacético. Ver Wood y Wetzel, 1992, *Int'l J. Peptide Protein Res.* 39: 533-39.

Otro enfoque descrito en la patente US nº 5.891.418 consiste en incluir un esqueleto de complejación de ión metálico en la estructura del péptido. Típicamente, el esqueleto de metal-péptido preferido está basado en el número necesario de grupos de coordinación particulares necesarios para la esfera de coordinación de un ión metálico de complejación dado. Generalmente, la mayoría de los iones metálicos que pueden resultar útiles presentan un número de coordinación de cuatro a seis. La naturaleza de los grupos de coordinación en la cadena peptídica comprenden los átomos de nitrógeno con funcionalidades amina, amida, imidazol, o guanidina; átomos de azufre o tioles o disulfuros; y átomos de oxígeno de funcionalidades hidroxilo, fenólica, carbonilo, o carboxilo. Además, la cadena peptídica o los aminoácidos individuales pueden ser modificados químicamente para incluir un grupo de coordinación, tal como por ejemplo oxima, hidrazino, sulfhidrido, fosfato, ciano, piridino, piperidino, o morfolino. El constructo peptídico puede ser lineal o cíclico, sin embargo es típicamente preferido un constructo lineal. Un ejemplo de un péptido lineal pequeño es Gly-Gly-Gly-Gly que presenta cuatro nitrógenos (un sistema de complejación N₄) en el esqueleto que puede complejar a un ión metálico con un número de coordinación de cuatro.

Otra técnica para mejorar las propiedades de los péptidos terapéuticos consiste en utilizar los peptidomiméticos no peptídicos. Puede ser utilizada una amplia variedad de técnicas útiles para establecer la estructura precisa de un péptido. Estas técnicas comprenden la secuenciación de aminoácidos, la cristalografía por rayos X, la espectroscopia de masas, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, el modelado molecular asistido por ordenador, el mapeo peptídico, y sus combinaciones. El análisis estructural de un péptido proporciona generalmente un cuerpo grande de datos que comprende la secuencia de aminoácidos del péptido así como el posicionamiento tridimensional de sus componentes atómicos. A partir de esta información, los peptidomiméticos no peptídicos pueden estar concebidos de manera que presenten las funcionalidades químicas necesarias para la actividad terapéutica pero son más estables, por ejemplo menos susceptibles a la degradación biológica. La patente US nº 5.811.512 proporciona un ejemplo de este enfoque.

Las técnicas para sintetizar químicamente los péptidos terapéuticos de la invención son descritas en las referencias anteriores y examinadas asimismo por Borgia y Fields, 2000, *TibTech* 18: 243-251 y descritas con mayor detalle en las referencias contenidas.

Para su utilización en terapia, las citocinas modificadas de la invención se formularán de manera adecuada en preparaciones farmacéuticas para administración oral o parenteral. Se prefieren las formulaciones para administración parenteral, y comprenden soluciones inyectables o suspensiones y líquidos para infusiones. Para la preparación de las formas parenterales, se disolverá o se pondrán en suspensión una cantidad eficaz del ingrediente activo en un vehículo esterilizado, añadiendo opcionalmente excipientes tales como disolventes, agentes de isotonicidad, conservantes, estabilizantes, emulsionantes o agentes dispersantes, y se distribuirá sucesivamente en viales sellados o ampollas.

Con mayor detalle, los conjugados de la invención, que comprenden polipéptidos y polinucleótidos, pueden estar preferentemente combinados con varios componentes para producir las composiciones de la invención. Preferentemente, las composiciones son combinadas con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica (que puede ser de utilización humana o animal). Los portadores y diluyentes adecuados comprenden las soluciones salinas isotónicas, por ejemplo un medio salino tamponado con fosfato. Los detalles de los excipientes pueden ser encontrados en *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edn, Eds Wade & Weller, American Pharmaceutical Association. La composición de la invención puede ser administrada por inyección directa. La composición puede ser formulada para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica.

La composición se puede formular de manera que la administración diaria, semanal o mensual proporcionará la dosis diaria deseada. Se apreciará que la composición puede estar convenientemente formulada para ser administrada con menor frecuencia, como cada 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 horas.

Los polinucleótidos/vectores que codifican los componentes polipeptídicos pueden ser administrados directamente como un constructo de ácido nucleico desnudo, comprendiendo además preferentemente las secuencias flanqueantes homólogas al genoma de célula huésped.

La captación de los constructos de ácido nucleico desnudo mediante las células de mamífero es aumentada mediante varias técnicas de transfección conocidas por ejemplo las que incluyen la utilización de los agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes comprenden los agentes catiónicos (por ejemplo el fosfato cálcico y el DEAE-dextrano) y los lipofectantes (por ejemplo lipofectamTM y transfectamTM). Típicamente, los constructos de ácido nucleico están mezclados con el agente de transfección para producir una composición.

ES 2 326 530 T3

Preferentemente, el polinucleótido o vector de la invención está combinado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Los diluyentes y portadores adecuados comprenden las soluciones salinas isotónicas, por ejemplo el medio salino tamponado con fosfato. La composición puede estar formulada para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica.

5

Las vías de administración y los regímenes de dosificación descritos se proporcionan únicamente como una guía dado que el experto en la materia podrá determinar fácilmente la vía óptima de administración y los regímenes de dosificación para cualesquiera paciente y estado particulares.

10

La preparación de citocinas en forma de liposomas puede mejorar la actividad biológica de las mismas. Se ha observado, de hecho, que la acilación de los grupos amino del TNF provoca un aumento en su hidrofobia sin pérdida de actividad biológica *in vitro*. Además, se ha descrito que el TNF unido a lípidos tiene citotoxicidad inalterada *in vitro*, efectos de inmunomodulación y toxicidad reducida *in vivo* (12, 13).

15

La dosis máxima tolerada de TNF en inyección intravenosa en embolada en seres humanos es de 218 a 410 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (32) aproximadamente 10 veces inferior a la dosis eficaz en animales. Basándose en los datos de los modelos murinos se cree que una dosis superior de por lo menos 10 veces es necesaria para conseguir efectos antitumorales en seres humanos (15). En el primer estudio clínico sobre perfusión hipertérmica aislada en las extremidades, se obtuvieron cantidades altas de respuesta con la dosis única de 4 mg de TNF en combinación con melfalán e interferón γ (16).

20

Otros trabajos demostraron que el interferón γ puede omitirse y que incluso dosis inferiores de TNF pueden ser suficientes para provocar una respuesta terapéutica (17, 18). Dado que las dos citocinas ejercen efectos sinérgicos sobre las células endoteliales, su direccionamiento combinado y selectivo en las mismas es probable que produzca una actividad antitumoral más potente permitiendo de este modo superar los problemas de toxicidad generalizada encontrados normalmente en la terapia del cáncer con las mismas citocinas utilizadas en combinación. Además, es sabido que el

25

TNF puede disminuir la función de barrera de los vasos con recubrimiento endotelial, aumentando de este modo su permeabilidad a las macromoléculas. Aprovechándose de la menor toxicidad del tratamiento con las moléculas de TNF modificadas según la invención, y sus vasos tumorales que contienen propiedades, una aplicación alternativa consiste en su utilización para aumentar la permeabilidad de los vasos tumorales a otros compuestos, para fines terapéuticos o de diagnóstico. Por ejemplo puede utilizarse el TNF modificado para aumentar la absorción del tumor de los anticuerpos u hormonas radiomarcadas (compuestos para detección por la imagen del tumor) en radioinmunoescintigrafía o radioinmunoterapia de los tumores. Alternativamente, la absorción de fármacos quimioterapéuticos, inmunotoxinas, liposomas que llevan fármacos o genes, u otros fármacos anticancerosos podría aumentarse también, de modo que sus efectos antitumorales aumenten.

30

Por consiguiente, las citocinas de la invención pueden utilizarse en preparaciones combinadas, por separado o sucesivas, asimismo con otras sustancias para diagnóstico o terapéuticas, en el tratamiento o en el diagnóstico del cáncer.

35

La presente invención se refiere a la utilización de una combinación del TNF modificado, y el IFN γ . Esta combinación puede ser utilizada en preparaciones secuenciales, separadas o combinadas. Ventajosamente, la combinación es asimismo con otras sustancias terapéuticas o de diagnóstico, en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer, tal como la doxorubicina y el melfalán. Por lo tanto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación del TNF modificado y el IFN γ , y opcionalmente otra sustancia terapéutica antitumoral o de diagnóstico tumoral. De nuevo, esta combinación se puede utilizar en preparaciones secuenciales, separadas o combinadas.

40

En la solicitud de patente número PCT/IB03/02187 de los presentes inventores, se ha descubierto que el suministro dirigido de dosis de picogramo de citocinas aumenta la penetración de los fármacos quimioterapéuticos, proporcionando una nueva e inesperada estrategia para aumentar el índice terapéutico de los fármacos quimioterapéuticos. La solicitud de patente número PCT/IB03/02187 se incorpora a la presente memoria en su totalidad como referencia. Con mayor detalle, se ha descubierto que el suministro de dosis muy bajas de citocinas a los tumores y al entorno asociado a los tumores que comprende la vasculatura tumoral representa un nuevo enfoque para evitar los mecanismos de retroalimentación negativa y para mantener su capacidad para modificar las barreras de penetración de fármaco.

50

La composición de la presente invención puede estar formulada para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica. En una forma de realización de este aspecto de la presente invención, se puede administrar un conjugado de la presente invención a una dosis comprendida en el intervalo de 0,5 a 500 ng/kg, preferentemente en el intervalo de 1 a 50 ng/kg, más preferentemente en el intervalo de 5 a 15 ng/kg.

55

60

En una forma de realización alternativa de este aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la presente invención en combinación con IFN γ , en la que el conjugado está presente en una cantidad tal que el conjugado o un metabolito del mismo está previsto en el plasma sanguíneo del sujeto que debe ser tratado en una cantidad no superior a aproximadamente 35.000 ng/día, preferentemente aproximadamente 3.500 ng/día, más preferentemente aproximadamente 1.000 ng/día.

65

La dosis anterior se refiere a una dosis para un sujeto de 70 kg. Un experto en la materia podrá fácilmente modificar la dosis para un sujeto que presente una masa diferente a 70 kg.

ES 2 326 530 T3

Las vías de administración y los regímenes de dosificación descritos se proporcionan únicamente como guía dado que un experto en la materia podrá determinar fácilmente la vía de administración y los regímenes de administración óptimos para cualesquiera paciente y estado.

5 Otro aspecto de la invención con respecto al ADNc que codifica las citocinas conjugadas dadas a conocer en la presente memoria, que pueden prepararse a partir del ADNc de citocinas por adición de una secuencia de ADN contigua a 5' ó 3' que codifica el ligando CD13 preferentemente para los péptidos de autoguiado descritos anteriormente. El ADNc combinado puede utilizarse como tal o tras la inserción en vectores para terapia génica. La preparación de aplicaciones terapéuticas de vectores adecuados se da a conocer en (19), que está incorporado a la presente memoria como referencia.

10 Los polinucleótidos de utilización en la invención comprenden las secuencias de ácido nucleico que codifican el conjugado de polipéptido de la invención. Resultará evidente para el experto en la materia que varios polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe apreciarse que los expertos en la materia, utilizando las técnicas de rutina, pueden realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos de la invención para reflejar el uso del codón de cualquier organismo huésped particular en el que los polipéptidos de la invención van a ser expresados.

20 Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Pueden ser asimismo polinucleótidos que comprenden en su interior nucleótidos sintéticos o modificados. Son conocidos en la técnica varios tipos diferentes de modificación para los oligonucleótidos. Comprenden los esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. En el contexto de la presente invención, debe apreciarse que los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden ser modificados mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden realizarse con el fin de mejorar la actividad *in vivo* o el periodo de vida de los polinucleótidos de la invención.

25 Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar a un vector replicable recombinante. El vector puede ser utilizado para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por lo tanto, en otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para preparar los polinucleótidos de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible, y cultivando la célula huésped en condiciones que provocan la replicación del vector. El vector puede ser recuperado de la célula huésped. Las células huésped adecuadas comprenden bacterias tales como *E. coli*, levadura, líneas celulares de mamífero y otras líneas celulares eucariotas, por ejemplo las células de insecto Sf9.

30 Preferentemente, un polinucleótido de la invención en un vector está unido de manera funcional a una secuencia de control que puede proporcionar la expresión de la secuencia de codificación mediante la célula huésped, es decir el vector es un vector de expresión. La expresión "unido de manera funcional" hace referencia a que los componentes descritos están en una relación que permite su funcionamiento deseado. Una secuencia reguladora "unida de manera funcional" a una secuencia de codificación está unida de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

35 Las secuencias de control pueden ser modificadas, por ejemplo mediante la adición de elementos reguladores de transcripción para aumentar la sensibilidad del nivel de transcripción dirigida por las secuencias de control a los moduladores de transcripción.

40 Los vectores de la invención pueden ser transformados o transfectados en una célula huésped adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de una proteína de la invención. Este procedimiento puede comprender el cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en condiciones que proporcionen la expresión por un vector de una secuencia de codificación que codifica la proteína, y opcionalmente recuperar la proteína expresada.

45 Los vectores pueden ser por ejemplo, vectores virales o plasmídicos provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a la neomicina para un vector de mamífero. Los vectores pueden ser utilizados, por ejemplo, para transfectar o transformar una célula huésped.

50 Las secuencias de control unidas de manera funcional a las secuencias que codifican la proteína de la invención comprenden promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control pueden ser seleccionadas para resultar compatibles con la célula huésped para la que el vector de expresión está concebido para su utilización. El término "promotor" es bien conocido en la técnica y comprende las regiones de ácidos nucleicos comprendidos en tamaño y complejidad entre los promotores mínimos y los promotores que incluyen potenciadores y elementos corriente arriba.

55 El promotor es típicamente seleccionado de entre los promotores que resultan funcionales en las células de mamífero, aunque pueden ser utilizados los promotores procariotas y los promotores funcionales en otras células eucariotas. El promotor es típicamente obtenido a partir de las secuencias de promotor o los genes eucariotas o virales. Por ejem-

ES 2 326 530 T3

5 plo, puede ser un promotor obtenido a partir del genoma de una célula en la que la expresión se va a producir. Con respecto a los promotores eucariotas, pueden ser promotores que funcionan de manera ubicua (tales como los promotores de α -actina, β -actina, tubulina) o, alternativamente, de manera específica para tejidos (tales como los promotores de los genes para la piruvato quinasa). Los promotores específicos para tejidos específicos para determinadas células pueden asimismo ser utilizados. Pueden asimismo ser promotores que responden a estímulos específicos, por ejemplo promotores que unen los receptores hormonales esteroideos. Los promotores virales pueden ser asimismo utilizados, por ejemplo el promotor de repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-LTR), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) LTR o el promotor del citomegalovirus humano (CMV) IE.

10 Puede asimismo resultar ventajoso para los promotores poder ser inducidos de manera que los niveles de expresión del gen heterólogo puedan ser regulados durante la vida de la célula. Que puedan ser inducidos hace referencia a que los niveles de expresión obtenidos utilizando el promotor pueden ser regulados.

15 Además, cualquiera de estos promotores puede ser modificado mediante la adición de otras secuencias reguladoras, por ejemplo secuencias potenciadoras. Los promotores quiméricos pueden ser asimismo utilizados comprendiendo los elementos de secuencia a partir de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

20 Los vectores y polinucleótidos de la invención pueden ser introducidos en las células huésped con el fin de replicar los vectores/polinucleótidos y/o expresar las proteínas de la invención codificadas por los polinucleótidos de la invención. Aunque las proteínas de la invención pueden ser producidas utilizando células procariontes como células huésped, resulta preferida la utilización de las células eucariotas, por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero, en particular células de mamífero.

25 Los vectores/polinucleótidos de la invención pueden ser introducidos en células huésped adecuadas utilizando una variedad de técnicas conocidas en la materia, como la transfección, la transformación y la electroporación. Cuando los vectores/polinucleótidos de la invención deben ser administrados a los animales, resultan conocidas varias técnicas en la materia, por ejemplo la infección con vectores virales recombinantes tales como retrovirus, virus del herpes simple y adenovirus, la inyección directa de ácidos nucleicos y la transformación biolística.

30 Las células huésped que comprenden los polinucleótidos de la invención pueden ser utilizadas para expresar los conjugados de la invención. Las células huésped pueden ser cultivadas en condiciones adecuadas que permiten la expresión de los polipéptidos y conjugados de la invención. La expresión de los productos de la invención pueden ser constitutivos de manera que son producidos de manera continua, o inducibles, requiriendo un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de la expresión inducible, la producción de proteínas puede ser iniciada cuando resulte necesaria mediante, por ejemplo, la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo dexametasona o IPTG.

Los conjugados de la invención pueden ser extraídos de las células huésped mediante una variedad de técnicas conocidas en la materia, que incluyen la lisis enzimática, química y/u osmótica y la ruptura física.

40 Descripción de las figuras

Figura 1: Efecto del TNF y NGR-TNF sobre el crecimiento de linfomas RMA-T (a y b) y sobre el peso del animal (c y d)

45 Se trataron 5 animales/grupo con una única dosis de TNF o NGR-TNF (i.p.), 10 días después de la implantación del tumor. Los valores del área tumoral el día 14 en función de la dosis (b) y la pérdida de peso después del tratamiento (media de los días 11 y 12) (d), se interpolaron en curvas logarítmicas. Los efectos antitumorales provocados por 1 μg o 9 μg de NGR-TNF el día 14 fueron mayores que los provocados por cantidades comparables de TNF ($P = 0,024$ y $P = 0,032$, respectivamente), mientras que la pérdida de peso después de estos tratamientos fue similar. Las flechas indican dosis extrapoladas de TNF y NGR-TNF que provocan efectos comparables.

Figura 2: Efecto del mAb R3-63 y de CNGRC sobre la actividad antitumoral de NGR-TNF (a) y TNF (b)

55 Se mezclaron mAb R3-63 o CNGRC con NGR-TNF o TNF y se administraron a animales con tumor RMA-T, 12 días después de la implantación del tumor ($n = 5$ animales/grupo). En un experimento por separado (c) TNF y NGR-TNF se administraron conjuntamente con CNGRC o CARAC (péptido de referencia) a animales que llevan tumores de 11 días ($n = 5$). El efecto antitumoral de 1 μg de NGR-TNF fue más potente que el de 9 μg de TNF ($P = 0,009$, prueba de la t el día 20) y fue inhibido de manera significativa por CNGRC ($P = 0,035$) y por mAb R3-63 ($P = 0,011$).

60 Figura 3: Efecto de la digestión triptica limitada de NGR-TNF y de TNF sobre su masa (a) y actividad antitumoral (b)

Se preparó tripsina-agarosa acoplado 1 mg de tripsina a 1 ml de CH Sepharosa activada (Pharmacia-Upjohn), según las instrucciones del fabricante. Se mezclaron NGR-TNF y TNF (170 μg de cada uno en 300 μl de cloruro sódico 0,15 M, fosfato sódico 0,05 M, pH 7,3) con 15 μl de suspensión de resina (1:4) o tampón solo y se hizo girar en un tambor vertical a 37°C durante el tiempo indicado. Se filtraron los cuatro productos a través de un dispositivo Spin-X de 0,22 μm (Costar, Cambridge, MA) y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. (a) Análisis de espectrometría de masas con electroatomización. Los valores de la masa molecular y los productos correspondientes (secuencias N-

terminales) están indicados en cada pico. Las flechas en las secuencias indican la zona de escisión. (b) Efecto de 1 ó 3 μg de NGR-TNF y TNF, incubados sin (paneles superiores) o con (paneles inferiores) tripsina, sobre el crecimiento de tumores RMA-T y el peso del animal (media \pm SE de grupos tratados con dosis de 1 a 3 μg). Se trataron los animales 13 días después de la implantación del tumor (n = 5 animales/grupo).

Figura 4: SDS-PAGE y actividad antitumoral de NGR-TNF humano antes y después de desnaturalización/replegamiento

SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) de TNF humano (a), antes de NGR-TNF (b) y después de (c) el proceso de desnaturalización/replegamiento descrito en el Ejemplo V.

Efecto de TNF y NGR-TNF sin replegar sobre el crecimiento de los linfomas RMA-T (B) y sobre el peso corporal (C). El efecto de TNF humano (D) y de NGR-TNF replegado (constituido por >95% de trímeros con disulfuros dentro de la cadena) (E) sobre el crecimiento del tumor. Se trataron animales (15 ó 5 ratones/grupo como se indica en cada panel) con una dosis i.p. de TNF o de NGR-TNF, 10 días después de la implantación del tumor.

Figura 5: Efecto de un anticuerpo anti-mIFN γ neutralizante (AN18) sobre la actividad antitumoral de NGR-m TNF y la doxorrubicina en los tumores B16F1 en los ratones C57BL6.

Figura 6: Efecto de NGR-TNF y la doxorrubicina en ratones con inactivación génica de IFN γ .

Figura 7: Efecto de NGR-m TNF, mIFN γ y doxorrubicina, (solo o en combinación) en los tumores B16F1 en ratones desnudos.

Figura 8: Efecto de NGR-TNF y la doxorrubicina en ratones desnudos.

Figura 9: Efecto de NGR-m TNF, mIFN γ y doxorrubicina, en tumores B16F1 en ratones inmunocompetentes (C57BL6).

Figura 10: IFN γ aumenta la penetración de doxorrubicina en tumores cuando combinan con NGR-TNF en ratones con inactivación génica de IFN γ .

Los ejemplos siguientes ilustran con mayor detalle la invención.

Ejemplo I

Preparación de TNF y NGR-TNF murinos

TNF murino recombinante y Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF (NGR-TNF) se produjeron por expresión del ADNc citoplásmico en *E. coli*. La codificación del ADNc para Met-TNF₁₋₁₅₆ murino (20) se preparó por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en el ARNm aislado de células de monocito-macrófago RAW-264.7 murinas estimuladas por lipopolisacáridos, utilizando 5'-CTGGATCCTCACAGAGCAATGACTCCAAAG-3' y 5'-TGCCTCACATATGCTCAGATCATCTTCTC-3' como cebadores 3' y 5'.

El fragmento ampliado se digirió con Nde I y Bam HI (New England Biolabs, Beverly, MA) y se clonaron en el pET-11b (Novagen, Madison, WI), digeridos previamente con las mismas enzimas (pTNF).

El ADNc que codifica Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF₁₋₁₅₆ fue ampliado por PCR en pTNF, utilizando 5'-GCA GATCATATGTGCAACGGCCGTTGCGGCCTCAGATCATCTTCTC-3' como cebador 5' y el cebador 3' anterior. El fragmento ampliado se digirió y se clonó en el pET-11b como se describió anteriormente y se utilizó para transformar células BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen). Se provocó la expresión de TNF y de NGR-TNF con isopropilo- β -D-tiogalactósido, según las instrucciones del fabricante del pET11b. Se recuperaron TNF y NGR-TNF solubles de los cultivos de dos litros por tratamiento con ultrasonidos de las bacterias en ácido etilendiamintetraacético 2 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 seguido de centrifugación (15.000 \times g, 20 min., 4°C). Se mezclaron ambos extractos con sulfato amónico (25% de saturación, se dejaron durante 1 h. a 4°C y se centrifugaron más, como anteriormente. El sulfato amónico en los sobrenadantes se llevó a continuación al 65% de saturación, se dejó a 4°C durante 24 h. y se centrifugó más. Se disolvió cada sedimento en 200 ml de sulfato amónico 1 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se purificó por cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Farmacia-Upjohn) (elución con gradiente, tampón A: fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, que contiene sulfato amónico 1 M; tampón B: glicerol al 20%, metanol al 5%, fosfato sódico 50 mM, pH 8,0). Las fracciones que contenían material inmunorreactivo TNF (por inmunotransferencia Western) se mezclaron, se dializaron frente a ácido etilendiamintetraacético 2 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 y se purificaron más por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose Fast Flow (Farmacia-Upjohn) (elución con gradiente, tampón A: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; tampón B: cloruro sódico 1 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Se mezclaron las fracciones que contenían inmunorreactividad a TNF y se purificaron por cromatografía con filtración en gel en Sephacryl-S-300 HR (Farmacia-Upjohn), se equilibraron previamente y se eluyeron con cloruro sódico 150 mM, tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 7,3 (PBS). Se agruparon las fracciones correspondientes a los productos de p.m. 40.000 a 50.000, se tomaron alícuotas y se almacenaron congeladas a -20°C. Todas las soluciones empleadas en las etapas cromatográficas se prepararon con agua esterilizada y exenta de endotoxinas (Salf, Bérsgamo, Italia). Los rendimientos finales fueron de 45 mg de TNF y 34,5 mg de NGR-TNF.

ES 2 326 530 T3

El peso molecular del TNF y NGR-TNF purificados se midieron por espectrometría de masas con electroatomización. Se midió el contenido en proteínas utilizando un kit de análisis de proteínas comercial (Pierce, Rockford, IL). El contenido en endotoxinas de NGR-TNF y de TNF fue de 0,75 unidades/ μg y de 1,38 unidades/ μg , respectivamente, medidas por la prueba cromógena *Lymulus Amoebocyte Lysate* (LAL) (BioWhittaker).

5

Se llevaron a cabo electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y análisis de inmunotransferencia Western utilizando geles de poliacrilamida al 12,5 ó 15%, por los procedimientos habituales.

Una pequeña cantidad de TNF y de NGR-TNF se purificó más por cromatografía por afinidad en el receptor soluble p55-TNF (sTNF-R1)-Sepharosa de la forma siguiente: se prepararon 5 mg de sTNF-RI recombinante tal como se describe (22) y se acopló a 2 ml de CH-Sepharose activada (Pharmacia), según las instrucciones del fabricante. Se lavaron extensamente dos columnas por separado (de un ml cada una), con soluciones esterilizadas y exentas de endotoxinas, se cargaron con TNF o NGR-TNF purificados en PBS y se desabsorbieron por elución con gradiente (1 h., tampón A: PBS; tampón B: cloruro sódico 0,5 M, glicina-HCl 0,2 M). Las fracciones que contienen TNF-antígeno se neutralizaron y se dializaron frente a la solución fisiológica esterilizada. Se añadió albúmina de suero humano exenta de endotoxinas antes del análisis (0,5 mg/ml) para evitar la adsorción de proteínas en las membranas. El contenido de TNF en cada fracción se determinó por ELISA y análisis citolítico.

SDS-PAGE no reductor del TNF presentaba una sola banda de 17 a 18 kDa, como cabía esperar para el TNF monomérico (no mostrado). En desacuerdo, la SDS-PAGE no reductora y el análisis por transferencia Western de NGR-TNF presentaron diferentes formas inmunorreactivas de 18, 36 y 50 kDa probablemente correspondientes a monómeros, dímeros y trímeros. En condiciones reductoras la mayoría de las bandas de 50 y 36 kDa se convirtieron en la forma de 18 kDa, apuntando la presencia de moléculas NGR-TNF con puentes disulfuro dentro de la cadena. La banda de 18 kDa contaba con aproximadamente 2/3 del material total, mientras que la de 36 kDa totalizaba la mayoría de la parte restante. Estos modelos electroforéticos sugieren que NGR-TNF era una mezcla de trímeros preparada por tres subunidades monoméricas con sulfuros correctos dentro de la cadena (por lo menos el 50%) y la mayor parte restante por trímeros con uno o más disulfuros dentro de la cadena. La banda de 36 kDa todavía observada reduciendo SDS-PAGE sugiere que NGR-TNF contenía también un dímero desnaturalizado irreversible (aproximadamente 10% del total).

30

Las masas moleculares de los monómeros de TNF y de NGR-TNF fueron de $17.386,1 \pm 2,0$ Da y de $17.843,7 \pm 2,5$ Da, respectivamente, por espectrometría de masas con electroatomización. Estos valores corresponden muy bien a la masa esperada para Met-TNF₁₋₁₅₆ (17.386,7 Da) y para CNGRCG-TNF₁₋₁₅₆ (17.844,2 Da).

35 Ejemplo II

Actividad citotóxica in vitro de TNF y NGR-TNF murinos

Se estimó por análisis citolítico normal la bioactividad de TNF y NGR-TNF basándose en fibroblastos de ratón L-M (ATCC CCL1.2) como se describe (23). Se determinó la actividad citolítica de TNF y NGR-TNF en células RMA-T en presencia de 30 ng/ml de actinomicina D. Cada muestra se analizó por duplicado a tres diluciones diferentes. Los resultados se expresan como media \pm SD de dos a tres análisis independientes.

La actividad citotóxica *in vitro* de TNF y NGR-TNF fue $(1,2 \pm 0,14) \times 10^8$ unidades/mg y de $(1,8 \pm 0,7) \times 10^8$ unidades/mg, respectivamente, por análisis citolítico normal con células L-M. Estos resultados indican que los restos CNGRCG en la molécula NGR-TNF no impiden el plegamiento, la oligomerización ni la fijación a receptores de TNF.

En un estudio anterior los autores demostraron que las células RMA-T pueden ser destruidas por TNF en presencia de 30 ng/ml de actinomicina D, mientras que en ausencia de inhibidores de transcripción estas células son resistentes a TNF, incluso después de varios días de incubación. La actividad citotóxica *in vitro* de NGR-TNF sobre las células RMA-T en presencia de actinomicina D fue de $(1,4 \pm 0,8) \times 10^8$ unidades/mg, medida utilizando TNF $((1,2 \pm 0,14) \times 10^8$ unidades/mg) como patrón. De este modo, las actividades citotóxicas de NGR-TNF y de TNF fueron similares tanto en células L-M como RMA-T.

55 Ejemplo III

Caracterización de la actividad terapéutica y tóxica de TNF y NGR-TNF murinos

El linfoma RMA provocado por el virus de Rauscher de origen C57BL/6 se mantuvo *in vitro* en RPMI 1640, 5% de suero bovino fetal (FBS), 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina, 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol 50 μM . RMA-T procedía de la estirpe de células RMA por transfección con un montaje que codifica el alelo Thy 1.1 y se cultivó como se describe (14).

Se cultivaron B16F1 de melanoma en RPMI 1640, FBS al 5%, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina, 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina B, glutamina 2 mM, MEM al 1% de aminoácidos no esenciales (BioWhittaker Europa, Verviers, Bélgica).

ES 2 326 530 T3

El Comité Ético del Instituto Científico del H. San Raffaele aprobó estudios *in vivo* en modelos animales y se llevaron a cabo según las directrices prescritas. C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italia) (16 a 18 g) se sometieron a la prueba de provocación con 5×10^4 células vivas RMA-T o B16F1, respectivamente, s.c. en el flanco izquierdo. Diez a doce días después de la implantación del tumor, se trataron los ratones, i.p. con 250 μ l de soluciones de TNF o NGR-TNF, diluidas con cloruro sódico al 0,9% exento de endotoxinas. Los experimentos preliminares demostraron que la actividad antitumoral no cambió por adición de albúmina de suero humano a soluciones de TNF y NGR-TNF, como vehículo. Se realizó cada experimento en 5 ratones por grupo. El crecimiento del tumor se controló a diario midiendo el tamaño del tumor con calibres. Se estimó el área del tumor calculando $r_1 \times r_2$, mientras que el volumen del tumor se estimó calculando $r_1 \times r_2 \times r_3 \times 4/3$, donde r_1 y r_2 son los radios longitudinal y lateral y r_3 es el espesor de los tumores que sobresalen de la superficie de la piel normal. Se sacrificaron los animales antes de que el tumor alcanzase un diámetro entre 1,0 y 1,3 cm. Los tamaños del tumor se presentan como media \pm SE (5 a 10 animales por grupo como se indica en las leyendas de la figura) y se compararon por la prueba de la t.

La actividad antitumoral y la toxicidad de NGR-TNF se compararon con las de TNF utilizando los modelos de linfoma RMA-T y de melanoma B16F1 en ratones C57BL6. Dado que el modelo RMA-T se ha caracterizado y utilizado anteriormente para estudiar la actividad antitumoral de TNF con diferentes protocolos de direccionamiento (26), los autores decidieron utilizar este modelo también en este estudio.

El TNF murino administrado a animales que llevan tumores de RMA-T s.c. probados, produce 24 horas después una reducción en la masa del tumor y necrosis hemorrágica en la parte central del tumor, seguido de un retardo de crecimiento significativo durante pocos días (26). Un solo tratamiento con TNF no provoca la regresión completa de este tumor, incluso a dosis próximas a la LD₅₀, ya que las células vivas que permanecen alrededor del área necrótica vuelven a surgir para crecer pocos días después del tratamiento.

En una primera serie de experimentos los autores investigaron el efecto de varias dosis (i.p.) de TNF o de NGR-TNF en la supervivencia animal. Para impedir sufrimiento excesivo, los animales se sacrificaron cuando el diámetro del tumor era mayor de 1 a 1,3 cm. La letalidad del TNF y de NGR-TNF, 3 días después del tratamiento, fue similar (LD₅₀, 60 μ g y 45 μ g, respectivamente) mientras que su actividad antitumoral fue notablemente diferente (Tabla 1).

TABLA 1

Supervivencia de ratones con linfoma RMA-T tratados con TNF o NGR-TNF murinos

Tratamiento	Animales (n)	Dosis (μ g)	Supervivencia (%) ^{a)} después del tratamiento							
			Día 3	Día 7	Día 14	Día 21	Día 30	Día 38 (2 ^a ch) ^{b)}	Día 62 (3 ^o ch.) ^{b)}	Día 92
Ninguno	18	0	100	0						
TNF	4	1	100	20	0					
	9	3	100	55	0					
	9	9	100	55	22	11	0			
	14	27	100	57	14	7	0			
	9	54	55	55	0					
9	108	0								
NGR-TNF	10	1	100	70	10	10	10	0		
	10	3	100	80	20	20	20	0		
	9	9	100	88	55	22	11	11	11	
	13	27	100	85	30	23	15	15	15	11
	9	54	33	33	0					
9	108	0								

a) Los animales con tumor fueron tratados con TNF o NGR-TNF (i.p.) 10 días después del implante del tumor. Los animales se sacrificaron cuando el diámetro del tumor excedía de 1 a 1,3 cm.

b) Los animales supervivientes se sometieron de nuevo a la prueba de provocación con 50.000 células RMA-T (segunda prueba de provocación) o con 50.000 RMA (tercera) en el periodo indicado. Se controló la oncogenicidad de las células inyectadas en cada periodo con 5 animales normales. Todos los animales de referencia desarrollaron un tumor a los 10 días (datos no mostrados).

Por ejemplo, 1 ó 3 μ g de NGR-TNF retardaron el crecimiento del tumor más eficazmente que 27 μ g de TNF, lo que indica que NGR-TNF era por lo menos un orden de magnitud más activo. Significativamente, algunos animales se curaron con dosis de NGR-TNF inferiores a las de la LD₅₀, mientras que ningún animal se curó con TNF. Los animales curados rechazaron más pruebas de provocación con dosis tumorígenas de células RMA-T o RMA naturales, lo que sugiere que un solo tratamiento con NGR-TNF era capaz de provocar inmunidad protectora. Es digno de mención que aumentando la dosis de TNF o de NGR-TNF aproximadamente 9 a 27 μ g aumentó notablemente la toxicidad y escasamente o nada la actividad terapéutica.

La pérdida de peso consiguiente al tratamiento con TNF es un signo bien conocido de toxicidad generalizada (26). De este modo, para comparar más la relación eficacia/toxicidad de TNF y de NGR-TNF se controló el crecimiento del tumor y el peso del animal después del tratamiento. El efecto de 1 μg de NGR-TNF sobre el crecimiento del tumor fue similar o mayor que el de 9 μg de TNF (Fig. 1a), mientras que la pérdida de peso uno a dos días después del tratamiento fue comparable a la de 1 μg de TNF (Fig. 1c). Cuando se interpola los datos en una curva logarítmica en una representación de la respuesta a la dosis los autores descubrieron que el efecto terapéutico de 9 μg de TNF el día 14 puede obtenerse con apenas 0,6 μg de NGR-TNF (Fig. 1b). En cambio, fueron necesarios 8,5 μg para provocar un efecto tóxico comparable (Fig. 1d). De este modo, la relación eficacia/toxicidad calculada de NGR-TNF en estas condiciones es 14 veces mayor que la de TNF.

Se obtuvieron resultados similares con el modelo de melanoma B16F1. El tratamiento con 1 μg de NGR-TNF el día 11 y el día 17, provocó una respuesta antitumoral el día 19 superior a la obtenida con 4 μg de TNF y similar a la obtenida con 12 μg de TNF (datos no mostrados). En cambio, la pérdida de peso producida por 1 μg de NGR-TNF fue notablemente inferior que la producida por 4 y 12 μg de TNF. El tratamiento con 12 μg de NGR-TNF produjo un efecto antitumoral aún más potente, mientras que el efecto tóxico fue similar al de 12 μg de TNF.

Cuando se puso una tercera inyección el día 19 se produjeron algunas muertes de animales 1 a 2 días después en todos los grupos (2 de cada 5 en el grupo tratado con solución salina y 12 μg de NGR-TNF y 1 de cada 5 en los grupos restantes). A destacar que, un animal tratado con 12 μg de NGR-TNF rechazó completamente el tumor. Cuando este animal se sometió a la prueba de provocación con una segunda dosis tumorigena de células B16F1, se desarrolló un tumor palpable tras 18 días, mientras que los animales de referencia desarrollaron un tumor a los 6 a 7 días.

Estos resultados, en conjunto, sugieren que la eficacia de NGR-TNF en la inhibición del crecimiento del tumor es 10 a 15 veces mayor que la del TNF mientras la toxicidad es similar. Sin embargo, NGR-TNF puede provocar respuestas inmunoprotectoras con más eficacia que TNF.

Ejemplo IV

Mecanismo de acción de NGR-TNF

El mAb R3-63 de CD13 anti-ratón se purificó en fluidos ascíticos por cromatografía en proteína-G Sefarosa (Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Suecia) y se dializó frente a cloruro sódico al 0,9%.

El antisuero policlonal de conejo se adquirió en Primm srl (Milán, Italia) y se purificó por cromatografía de afinidad en proteína-A-Sefarosa (Pharmacia-Upjohn). Se prepararon los péptidos CNGRC y CARAC como se describió anteriormente (28).

Para proporcionar pruebas de que la actividad mejorada de NGR-TNF depende del direccionamiento del tumor por el resto NGR los autores han investigado si la actividad *in vivo* de NGR-TNF puede ser parcialmente competida por CNGRC. Hasta este extremo los autores han administrado NGR-TNF (1 μg) a ratones con tumor RMA-T, con o sin un exceso molar de CNGRC. En paralelo, se trataron otros animales con TNF (3 ó 9 μg), otra vez con o sin CNGRC. Como era de esperar, CNGRC disminuyó significativamente la actividad antitumoral de NGR-TNF (Fig. 2a) pero no la de TNF (Fig. 2b). En desacuerdo, un péptido de referencia (CARAC) fue incapaz de producir una disminución significativa de la actividad de NGR-TNF (Fig. 2c). Estos resultados sugieren que CNGRC compite por la fijación de NGR-TNF a un receptor de CNGRC, y apoya la hipótesis de un mecanismo de direccionamiento para la actividad mejorada. A destacar que CNGRC fue incapaz de disminuir la actividad citotóxica *in vitro* de NGR-TNF (datos no mostrados).

Como se ha descrito recientemente que la aminopeptidasa N (CD13) es un receptor para los péptidos CNGRC, los autores investigaron a continuación la contribución de este receptor en el mecanismo de direccionamiento de NGR-TNF. Hasta este extremo, los autores estudiaron el efecto de un mAb anti-CD13 (R3-63) sobre la actividad antitumoral de NGR-TNF y TNF. El mAb R3-63 inhibió de manera significativa la actividad antitumoral de NGR-TNF (Fig. 2a) pero no la del TNF (Fig. 2b) lo que indica que CD13 está de hecho críticamente implicado en la actividad antitumoral de NGR-TNF. No se observó ninguna expresión de CD13 sobre la superficie de las células RAM-T por análisis FACS de las células cultivadas con el mAb R3-63 (no mostrado), lo que sugiere que otras células fueron reconocidas por el anticuerpo *in vivo*.

Aunque estos datos indican que CD13 es un receptor importante para NGR-TNF, no se puede excluir completamente que la fijación a otros receptores de NGR no identificados todavía contribuye también, no obstante en menor extensión, al mecanismo de direccionamiento.

Los experimentos preliminares de la proteólisis parcial demostraron que el enlace Arg-Ser en el segmento N-terminal de TNF (restos 2 a 3) es muy sensible a la tripsina, mientras que el resto de la molécula es mucho más resistente. De este modo, para proporcionar más pruebas de que la actividad mejorada de NGR-TNF está relacionada con su resto NGR, los autores trataron de escindir el dominio NGR en la zona N-terminal de la mutéina mediante digestión parcial con tripsina inmovilizada. Este tratamiento convirtió tanto a NGR-TNF como a TNF en una molécula correspondiente al fragmento TNF3-156 (masa esperada 16986,2 Da; véase la Fig. 3a para la masa medida y las secuencias esperadas).

ES 2 326 530 T3

Aunque la digestión no disminuyó la actividad citolítica *in vitro* de NGR-TNF sobre las células L-M ($2,3 \pm 1,4 \times 10^8$ U/mg) su actividad antitumoral *in vivo* disminuyó hasta el nivel del TNF (Fig. 3b). A destacar que la toxicidad de NGR-TNF y de TNF eran similares tanto antes como después de la digestión, como se interpreta a partir de la pérdida de peso del animal un día después del tratamiento (Fig. 3b, panel derecho), lo que sugiere que el mecanismo de direccionamiento dependiente de NGR no altera la toxicidad.

Ejemplo V

Preparación y caracterización de TNF y NGR-TNF humanos

Se prepararon TNF y NGR-TNF recombinantes humanos (constituídos por TNF1-157 humano fusionado con el terminal C de CNCRG) por tecnología de ADN recombinante y se purificaron esencialmente como se describe para TNF y NGR-TNF murinos. La codificación del ADNc para NGR-TNF humano fue preparada por PCR en el plásmido pET11b/hTNF que contenía la secuencia de codificación hTNF (33), utilizando los cebadores siguientes:

- NGR-hTNF/1 (transcrito): 5' A TAT CAT ATG TGC AAC GGC CGT TGC GGC GTC AGA TCA TCdT TCT CG 3'.
- NGR-hTNF/2 (complementario): 5' TCA GGA TCC TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC 3'.

El fragmento ampliado se digirió y se clonó en el pET11b (Nde I/BamH I) y se utilizó para transformar las células BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen). La expresión de NGR-hTNF fue provocada con isopropilo- β -D-tiogalactósido, según la instrucción del fabricante del pET11b. Se recuperó el NGR-TNF soluble de los cultivos de dos litros por tratamiento con ultrasonidos de las bacterias en ácido etilendiamintetraacético 2 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, seguido de centrifugación ($15.000 \times g$, 20 min., 4°C).

El extracto se mezcló con sulfato amónico (35% de saturación), se dejó durante 1 h. a 4°C y se centrifugó más, como anteriormente. El sulfato amónico en los sobrenadantes se llevó a continuación hasta el 65% de saturación, se dejó a 4°C durante 24 h. y se centrifugó más. Se disolvió cada sedimento en sulfato amónico 1 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se purificó por cromatografía de interacción hidrófoba en Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (elución con gradiente, tampón A: fosfato sódico 100 mM, pH 8,0, que contiene sulfato amónico 1 M; tampón B: etilenglicol al 70%, metanol al 5%, fosfato sódico 100 mM, pH 8,0). Las fracciones que contenían material inmunorreactivo de TNFh (por ELISA) se mezclaron, se dializaron frente a Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 y se purificaron más por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Upjohn) (elución con gradiente, tampón A: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; tampón B: cloruro sódico 1 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Todas las soluciones empleadas en las etapas cromatográficas se prepararon con agua esterilizada y exenta de endotoxinas (Salf, Bérghamo, Italia).

En este punto, aproximadamente 30 mg de TNF y 32 mg de NGR-TNF se recuperaron de los cultivos de dos litros. SDS-PAGE no reductor presentó bandas correspondientes a los monómeros, dímeros y trímeros, lo que sugiere que también NGR-TNF humano era una mezcla de trímeros con disulfuros en el interior de la cadena correctos y trímeros con uno o más puentes de disulfuro dentro de la cadena (Fig. 4A, banda b), observados con NGR-TNF murino.

Se aislaron trímeros con puentes disulfuro dentro de la cadena correctos a partir de esta mezcla mediante un proceso de desnaturalización por replegamiento en cuatro etapas de la manera siguiente: se desnaturalizó NGR-TNF humano purificado con urea 7 M y se filtró en gel a través de una columna HR Sephacryl S-300 (1025 ml) (Pharmacia) equilibrada previamente con urea 7 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Se mezclaron las fracciones correspondientes al TNF monomérico, se ultrafiltraron a través de una membrana YM MWCO de 10 kDa (Amicon) y se replegaron por diálisis frente a 33 volúmenes de urea 2,33 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8 a 4°C (140 min.) seguido de urea 1,55 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8 (140 min.) y urea 1 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8 (140 min.). Por último se dializó el producto frente a 80 volúmenes de Tris-HCl 100 mM (16 h.), se centrifugó a $13.000 \times g$ (30 min.), se filtró a través de una membrana SFCA de $0,45 \mu\text{m}$ (Nalgene) y se filtró en gel a través de una columna HR Sephacryl S-300 (1020 ml) equilibrada previamente con cloruro sódico 0,15 M, fosfato sódico 0,05 M (PBS). Se recuperaron aproximadamente 23 mg de la proteína replegada.

El producto final era en su mayor parte monomérico después de SDS-PAGE no reductor (Fig. 4A, banda c), tenía un volumen hidrodinámico similar al del TNF humano trimérico por HPLC analítica con filtración en gel en una columna Superdex 75 HR (no mostrada) y tenía una masa molecular de $17937,8 + 1,8$ Da (esperada para CNCRG-TNF1-157, $17939,4$ Da) por espectrometría de masas con electroatomización. Las actividades citolíticas *in vitro* de NGR-TNF sin replegar y replegado sobre las células L-M de ratón fueron $(6,11 \times 10^7) + 4,9$ y $(5,09 \times 10^7) + 0,3$ unidades/mg respectivamente, mientras que la del TNF humano purificado fue de $(5,45 \times 10^7) + 3,1$ unidades/mg. Estos resultados sugieren que el proceso de desnaturalización por replegamiento no afectó la interacción de NGR-TNF humano con el receptor p55 murino.

La actividad antitumoral *in vivo* de $1 \mu\text{g}$ de NGR-TNF humano (sin replegar) fue superior a la de $10 \mu\text{g}$ de TNF (Fig. 4B) mientras que la toxicidad, interpretada por la pérdida de peso del animal, fue significativamente inferior (Fig. 4C). Después del replegamiento de $0,3 \mu\text{g}$ de NGR-TNF fue suficiente para provocar un efecto antitumoral más fuerte que el conseguido con $10 \mu\text{g}$ de TNF (Fig. 4D, 4E).

ES 2 326 530 T3

Estos resultados indican que la actividad antitumoral del NGR-TNF humano es mayor que la del TNF humano.

Además, los autores han observado que el NGR-TNF humano replegado y de ratón pueden provocar efectos anti-tumorales significativos en los ratones con RMA-T incluso a dosis muy bajas (1 a 10 ng/ratón) sin pruebas de efectos tóxicos, mientras que TNF fue incapaz de provocar efectos significativos a estas dosis (no mostrado).

Ejemplo VI

Preparación y caracterización de NGR-IFN γ de ratón

Se preparó interferón murino recombinante (IFN γ) fusionado con CNGRCG (NGR-IFN γ) por tecnología de ADN recombinante, esencialmente como se describe para el NGR-TNF. El dominio de CNGRC se fusionó con el terminal C de IFN γ . Además la cisteína en la posición 134 se sustituyó con una serina; se introdujo una metionina en la posición -1 para la expresión en las células de *E. coli*. Los cebadores de PCR utilizados para la producción del ADNc de NGR-IFN γ fueron: 5'-A TAT CTA CAT ATG CAC GGC ACA GTC ATT GAA AGC C (transcrito) y 5'-TC GGA TCC TCA GCA ACG GCC GTT GCA GCC GGA GCG ACT CCT TTT CCG CTT CCT GAG GC. Se clonó el ADNc en el pET-11b (Nde I/BamHI) y se utilizó para transformar células BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen). Se provocó la expresión de la proteína con isopropilo- β -D-tiogalactósido, según la instrucción del fabricante del pET11b. El producto se purificó a partir de los extractos de *E. coli* por cromatografía de inmunoafinidad utilizando un mAb (AN18) de IFN γ anti-ratón inmovilizado en agarosa, según las técnicas habituales. La SDS-PAGE reductora y no reductora del producto final presentaba una sola banda de 16 kDa. La espectrometría de masas con electroatomización presentaba un peso molecular de 16223 + 3,6 Da (esperado, 1625,5 Da) correspondiente al Met-IFN γ 1-134(C134S)CNGRC(NGR-IFN γ) murino.

La capacidad de NGR-IFN γ y NGR-TNF para competir en la fijación de un anticuerpo anti-CD13 con el tumor asociado a los vasos sanguíneos fue investigada utilizando un método inmunohistoquímico.

Muestras quirúrgicas recientes de carcinoma de células renales humanas se obtuvieron en el Departamento de Histopatología del San Raffaele H Scientific Institute. Se prepararon secciones (5 a 6 μ m de espesor) de muestras empapadas en parafina fijadas en Bouin (4 a 6 h.) y se adsorbieron en portaobjetos recubiertos con polilisina. Se detectaron antígenos CD13 utilizando el procedimiento del complejo avidina-biotina de la manera siguiente: las secciones de tejido se rehidrataron utilizando xilenos y series de alcohol graduado, según procedimientos habituales. Las secciones de tejido se colocaron en un vaso que contenía EDTA 1 mM y se hirvieron durante 7 min. utilizando una estufa a microondas (1.000 W). El recipiente se rellenó a continuación con EDTA 1 mM y se hirvió de nuevo durante 5 min. Las secciones de tejido se dejaron enfriar y se incubaron en PBS que contenía peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 15 min., para enfriar la peroxidasa endógena. Las muestras se a continuación y se enjuagaron con PBS y se incubaron con 100 a 200 μ l de PBS-BSA (1 h. a temperatura ambiente) seguido del mAb WM15 (anti-CD13h), solo o mezclado con varios agentes competitivos (véase la Tabla 2) en PBS-BSA (durante la noche a 4°C). Los portaobjetos se lavaron a continuación tres veces (3 min. cada uno) con PBS y se incubaron con PBS-BSA que contenía suero de caballo normal al 2% (PBS-BSA-NHS) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 5 min. La solución se sustituyó a continuación por 3 μ g/ml de IgG (H+L) anti-ratón de caballo biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA) en PBS-BSA-NHS y se incubaron durante 1 h. más a temperatura ambiente. Se lavaron los portaobjetos de nuevo y se incubaron durante 30 min. con reactivo Vectastain Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1:100 en PBS. Se disolvió a continuación un comprimido de 3,3'-diamino-benzidina-tetrahidrocloruro (Merck, Darmstadt, Alemania) en 10 ml de agua desionizada que contenía peróxido de hidrógeno al 0,03%, filtrado a través de una membrana de 0,2 μ m y cubierto sobre las secciones de tejido durante 5 a 10 min. Los portaobjetos se lavaron como anteriormente y se tiñeron por contraste con hematoxilina de Harris. Se identificaron los vasos asociados al tumor mediante secciones en serie de tinción del tejido con un mAb anti-CD31 (mAb JC/70A, CD31 anti-humano, IgG1, de DAKO, Copenhague, Dinamarca).

En la Tabla 2 se resumen los resultados. Como se muestra, la fijación de WM15 a los vasos asociados al tumor fue inhibida por un exceso de NGR-TNF, NGR-IFN γ y CNGRC, pero no por otros reactivos de control que carecen del motivo NGR. Esto sugiere que el punto de fijación de NGR en CD13 se solapa estéricamente con el epítipo WM15. En cambio, NGR-TNF fue incapaz de competir por la fijación de 13C03 con las células epiteliales.

Los autores llegan a la conclusión de que el resto NGR de NGR-IFN γ y NGR-TNF puede interactuar con la forma CD13 reconocida por el mAb WM15 en los vasos asociados al tumor. Además, estos resultados indican que el motivo CNGRC es funcional cuando se une al terminal N o al terminal C de una citocina.

TABLA 2

Fijación de WM15 a las secciones con cáncer de células renales en presencia de varios competidores

Competidor	Fijación de WM15 a vasos asociados al tumor
Ninguno	+
NGR-TNF (25 µg/ml)	-
NGR-IFN γ (50 µg/ml)	-
GNGRC (100 µg/ml)	-
TNF (25 µg/ml)	+
Albúmina de suero humano (25 µg/ml)	+
CgA sintético(60-68) (100 µg/ml)	+

^a El competidor, en PBS que contiene BSA al 2%, se añadió en la etapa de bloqueo y se mezcló con el anticuerpo primario.

^b mAb WM15 (CD13 anti-humano, IgG1) era de Pharmingen (San Diego, CA); el péptido sintético CgA(60-68) corresponde al fragmento 60-68 de la cromogranina A.

Ejemplo VII

Suministro dirigido de NGR-TNF biotinilado a tumores utilizando anticuerpos antitumorales y avidina (direccionamiento previo)

El ejemplo siguiente, ilustra la posibilidad de “doble” direccionamiento de TNF, basándose en la combinación de un anticuerpo que contiene el tumor y un péptido CNGRC.

Se preparó un conjugado de biotina-NGR-TNF mezclando NGR-TNF con el éster N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinil-6-aminocaproico (Società Prodotti Antibiotici S.p.A., Milán, Italia), en tampón de carbonato sódico 1 M, pH 6,8 (3 h. a temperatura ambiente) (21). Se bloqueó la reacción con Tris-HCl 1 M, pH 7,5.

Se caracterizó el conjugado por espectrometría de masas y se encontró que contenía 1 biotina/trímero (de promedios). Los C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italia) se sometieron a continuación a la prueba de provocación con células vivas 5×10^4 RMA-T, s.c. en el costado izquierdo. Cuando el área del tumor alcanzó 40 mm², se trataron los ratones con inyecciones sucesivas de anticuerpo biotinilado, avidinas y biotina-TNF según un protocolo de “tres días” como se describió anteriormente (26). Se inyectó: 40 µg de biotina-mAb19E12 (i.p., etapa I), 60 µg de avidina y 60 µg de estreptavidina después de 18 y 19 h., respectivamente (i.p., etapa II), 3 µg de biotina-NGR-TNF, 24 h. después (i.p., etapa III). Se diluyó cada compuesto con una solución esterilizada de cloruro sódico al 0,9%. En el experimento de referencia, se omitieron la avidina y la estreptavidina. Cada experimento se realizó con 5 ratones/grupo. Se controló el crecimiento del tumor a diario midiendo el tamaño del tumor con calibres. Las áreas del tumor antes y 10 días después del tratamiento fueron 39±4 mm² y 8±5 mm², respectivamente, en el grupo tratado con mAb 19E12-biotina/avidina/estreptavidina/biotina-NGR-TNF (5 animales, media±SE). En el grupo de referencia (tratado con mAb 19E12-biotina/biotina-NGR-TNF solo) las áreas del tumor antes y 10 días después del tratamiento fueron 40±4 mm² y 20±6 mm² respectivamente, lo que indica que el direccionamiento previo con el anticuerpo que contiene el tumor y avidina ha aumentado la actividad de NGR-TNF.

Ejemplo VIII

Actividad sinérgica entre NGR-TNF e interferón- γ

Las células de melanoma de B16F1 de ratón fueron cultivadas como se describió anteriormente (Curnis *et al.*, 2000; Moro *et al.*, 1997).

El anticuerpo monoclonal anti-IFN γ neutralizante AN18 fue amablemente suministrado por P. Dellabona, Milan, Italia). La doxorubicina (Adriblastina) se adquirió en Pharmacia-Upjohn (Milan, Italia). El IFN γ múrido recombinante se adquirió en Peptotech Inc. (USA) (contenido en endotoxinas: < 1 unidades/µg). Las células TS/A de un adenocarcinoma de mamífero espontáneo BALB/c se cultivaron en medio RPMI 1640, suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 0,25 µg/ml de anfotericina B, 2 mM de glutamina y medio esencial mínimo al 1% con aminoácidos no esenciales (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium).

El TNF múrido y el TNF-NGR (constituido por TNF fusionado con el C-terminal de CNGRCG) fueron preparados con tecnología de ADN recombinante y purificados a partir de extractos de células de *E. coli*, como se ha descrito (Cumis, *et al.*, 2000). Todas las soluciones utilizadas en las etapas cromatográficas se prepararon con agua libre de endotoxinas y estéril (Salf, Bergamo, Italia). La concentración de proteínas se midió con un kit de ensayo de

cuantificación de proteínas comercial (Pierce, Rockford, IL). La actividad citolítica de NGR-m TNF fue $9,1 \times 10^7$ unidades/mg. El volumen hidrodinámico de NGR-mTNF fue similar al de TNF, una proteína homotrimérica (Smith y Baglioni, 1987), mediante cromatografía de filtración de gel en una columna Superdex 75 HR (Pharmacia, Suecia). El contenido de endotoxinas de NGR-m TNF fue de 0,082 unidades/ μg .

5 Las manipulaciones de ADN se realizaron mediante procedimientos de ADN recombinante estándares. La codificación de ADNc para el IFN γ múrido se preparó mediante PCR en ADNc obtenido a partir de linfocitos múridos estimulados con forbol 12-miristato 13-acetato, utilizando los cebadores siguientes: 5' AGAATTCATGAACGCTACACACT GCATCTTGGC 3' (cebador directo); 5' TATATTAAGCTTTCAGCAGCGACTCCTTTTCCGC 3' (cebador inverso).
 10 Los cebadores están concebidos para amplificar la secuencia de ADNc que codifica el IFN γ de ratón de longitud total, comprendiendo la secuencia líder. Comprenden el sitio de restricción *Hind*III y *Eco*RI (subrayado) para la clonación en el vector de expresión de mamífero pRS1-neo, para generar pRS1neo-IFN γ . Se preparó a continuación pRS1 neo-IFN γ utilizando el Kit Plasmid Maxi (Qiagen Inc. -Diagen, GmbH, Alemania) y se diluyó a 1 mg/ml en agua libre de endotoxinas y estéril (S.A.L.F. Laboratorio Farmacologico SpA, Bergamo, Italia). Se mezcló pRS1 neo-IFN γ (3 μg)
 15 con 100 μl de 0,03 mg/ml de reactivo Lipofectina (Gibco Brl) en RPMI 1640 y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a continuación a células TS/A depositadas en placas de microtitulación de 24 pocillos 1 día antes (4×10^4 células por pocillo en 200 μl de medio de cultivo). Tras la incubación a 37°C, CO₂ al 5% durante 4 h, se añadieron 2 ml de medio de cultivo a cada pocillo. Tras 48 h de la incubación el medio de cultivo fue modificado con RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, 2 mM de glutamina y que contiene 1 mg/ml de geneti-
 20 cina. Tras una semana, las células que sobrevivieron a la selección se clonaron mediante dilución limitante en placas de microtitulación de 96 pocillos en presencia de geneticina. Los sobrenadantes de cada clon se sometieron a ensayo mediante IFN μ -ELISA. Se obtuvieron diez clones que secretan IFN γ . Se seleccionó y se utilizó para los experimentos *in vivo* un clon, denominado TS/A-IFN γ , que produce 1,13 μg de IFN γ por ml de medio de cultivo.

25 IFN γ -ELISA

Las placas de microtitulación de PVC (Becton Dickinson, cod. 3912) se recubrieron con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mAb AN18 en PBS (16 a 4°C). Las placas se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% (BSA) en PBS (PBS-BSA, 1 h a 37°C). Las placas se lavaron entonces tres veces con PBS incubado con sobrenadantes de
 30 cultivo celular o soluciones estándares de IFN γ de ratón diluidas en PBS-BSA. Las placas se lavaron ocho veces con PBS que contiene Tween-20 (Merck) al 0,05% (PBS-TW) y se incubaron con mAb XMG1,bio (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, 1 h a 37°C). Las placas se lavaron de nuevo con PBS-TW y se incubaron durante 1 h a 37°C con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluida 1:3.000 en PBS-BSA. Tras el lavado con PBS-TW, la peroxidasa ligada se detectó con un sustrato de peroxidasa de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (Sigma). La reacción cromogénica se bloqueó tras 30 min mediante la adicción de ácido sulfúrico al 10%. El A₄₉₀ se midió con un lector de microplacas ELISA (Biorad).

Los estudios de modelos de animales fueron aprobados por el Ethical Committee del San Raffaele H Scientific Institute y se realizaron según las directrices recomendadas. Los ratones C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italia) de un peso de 16 a 18 g se expusieron a inyección subcutánea en el lado izquierdo de células vivas B16F1 o 5×10^4 ; 5 días más tarde, los ratones fueron tratados con soluciones de NGR-mTNF y mIFN γ (100 μl) seguido 2 h por la administración de una solución de doxorubicina (100 μl). Todos los fármacos se administraron intraperitonealmente (i.p.). Los fármacos se diluyeron con cloruro sódico al 0,9%, que contiene 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina de suero humano libre de endotoxinas (Farma-Biagini, Lucca, Italia), con la excepción de la doxorubicina, que se diluyó con cloruro
 45 sódico al 0,9% solo. El crecimiento tumoral se controló diariamente midiendo los tumores con calibradores como se ha descrito anteriormente (Gasparri *et al.*, 1999). Los animales se sacrificaron antes de que los tumores alcanzasen un diámetro de 1,0 a 1,5 cm. Los tamaños tumorales se representan como \pm SE promedio (5 animales/grupo).

50 *Ifny* endógeno resulta de importancia fundamental para la actividad terapéutica de NGR-TNF/doxorrubicina

Se ha demostrado anteriormente que NGR-mTNF y doxorubicina desempeñan efectos sinérgicos en ratones inmunocompetentes portadores de tumor B16-F1, siendo la actividad antitumoral de la doxorubicina significativamente aumentada mediante la preadministración de 0,1 ng de NGR-mTNF (anteriormente y Curnis *et al.*, 2002). Por lo tanto, la administración de cantidades bajas de NGR-mTNF (0,1 ng) en combinación con doxorubicina (80 μg) a ratones
 55 portadores de tumor B16-F10 indujo unos efectos antitumorales más potentes que los obtenidos con la doxorubicina sola (figura 5). Estos fármacos actúan sinérgicamente, ya que NGR-TNF solo resulta poco activo cuando es utilizado en bajas dosis (0,1 ng) (Curnis *et al.*, 2002).

Para evaluar la importancia funcional del mIFN γ endógeno en la actividad antitumoral de NGR-mTNF en los ratones inmunocompetentes, se estudió el efecto de un anticuerpo anti-mIFN γ neutralizante (mAb AN18) sobre la actividad antitumoral de NGR-mTNF/doxorrubicina en ratones C57BL6.

Cuando este anticuerpo se administró 24 horas antes que NGR-mTNF, se suprimió el efecto sinérgico entre NGR-mTNF y la doxorubicina (figura 5), avalando la hipótesis de que el mIFN γ endógeno desempeña un rol importante en la actividad antitumoral de NGR-mTNF.

Para respaldar además el rol del IFN γ en la respuesta terapéutica a estos fármacos se realizaron en el contexto de la presente invención otros experimentos *in vivo* utilizando ratones con “inactivación génica” BALB/c IFN γ ^{-/-}, portadores de tumores de adenocarcinoma mamario-TS/A de ratón subcutáneos. Paralelamente, se realizaron en el contexto de la presente invención experimentos similares utilizando ratones BALB/c IFN γ ^{+/+} de tipo salvaje. NGR-TNF/doxorubicina redujo significativamente la masa tumoral en los ratones BALB/c IFN γ ^{+/+} (figura 6, barras en negro), pero no en los ratones BALB/c IFN γ ^{-/-} (barras en blanco). Especialmente, la administración de IFN γ exógeno (300 ng) en combinación con NGR-TNF y doxorubicina a ratones BALB/c IFN γ ^{-/-}, restituyó la sinergia entre estos fármacos (figura 6, barras en blanco). Estos resultados confirman la hipótesis que consiste en que IFN γ resulta necesario para la actividad sinérgica de NGR-TNF/doxorubicina. La coadministración de IFN γ y doxorubicina sin NGR-TNF no indujo unos efectos antitumorales significativos en los ratones BALB/c IFN γ ^{-/-}, (figura 6, barras en blanco) indicando que esta citocina actúa sinérgicamente con NGR-TNF, y poco o nada con la doxorubicina.

Rol de los linfocitos T y del IFN γ producido localmente en la actividad terapéutica NGR-TNF/doxorubicina

Las linfocitos T y las células NK son las fuentes principales del IFN γ en los ratones inmunocompetentes. Para analizar la importancia de los linfocitos T como fuente del IFN γ en la terapia combinada de NGR-TNF/doxorubicina se analizó el efecto de estos fármacos en los ratones *nu/nu* portadores de tumor B16F1, que carecen de los linfocitos T. En este modelo, la actividad sinérgica de NGR-TNF/doxorubicina se perdió (figura 7A-C). Sin embargo, estos fármacos se administraron en combinación con IFN γ , apreciándose de nuevo el efecto sinérgico (figura 7D). Es probable que la cantidad de IFN γ endógeno en estos animales no resultara suficiente para activar la sinergia NGR-TNF/doxorubicina, mientras que la administración del IFN γ exógeno restauró la sinergia.

Los resultados de los experimentos *in vivo* con ratones inmunocompetentes y *nu/nu* pueden indicar que los linfocitos T presentes en la masa tumoral de los ratones inmunocompetentes, pero no de los ratones *nu/nu*, producen cantidades suficientes de IFN γ para estimular una respuesta sinérgica entre NGR-TNF y la quimioterapia. Para valorar si la producción de IFN γ en el microentorno tumoral podría restaurar el efecto sinérgico en los ratones *nu/nu*, se transfectaron las células TS/A con el ADNc de IFN γ múrido (figura 8). Se seleccionó un clon que puede secretar IFN γ en el medio de cultivo y se denominó TS/A-IFN. El TS/A-IFN y las células TS/A de tipo salvaje fueron a continuación implantadas, subcutáneamente, en los ratones *nu/nu*. Como era de esperar, NGR-TNF/doxorubicina ejerció unos efectos antitumorales significativos contra TSA-IFN, pero no contra los tumores TS/A, indicando de manera convincente que el IFN γ producido localmente resulta en efecto de importancia fundamental para la sinergia NGR-TNF/doxorubicina.

En conclusión, estos resultados y los anteriores indican que la actividad terapéutica de NGR-TNF/doxorubicina depende plenamente de la producción local de IFN γ , probablemente secretado por los linfocitos de infiltración tumoral.

El IFN γ exógeno potencia la actividad terapéutica de NGR-TNF/doxorubicina en los ratones inmunocompetentes

La actividad terapéutica de NGR-TNF y la doxorubicina, en combinación con el IFN γ exógeno, (300 ng) se evaluó a continuación utilizando ratones C57B16 portadores de tumores B16F1. Como se ha representado en la figura 9, la actividad antitumoral de la triple combinación fue superior que la de NGR-TNF/doxorubicina. Así, la administración del IFN γ exógeno, junto con NGR-TNF/doxorubicina, indujo asimismo un efecto antitumoral más potente en los ratones inmunocompetentes.

Mecanismo de acción de la combinación triple (IFN γ , NGR-TNF y doxorubicina)

Se ha mostrado anteriormente que un mecanismo importante para la sinergia NGR-TNF/doxorubicina está relacionado con la alteración de una función de barrera endotelial mediante NGR-TNF y la penetración aumentada de la doxorubicina, en los tumores. Así, se examinó si IFN γ resulta de importancia fundamental para este efecto. Con este fin se midió el efecto del IFN γ exógeno sobre la penetración de la doxorubicina en los tumores TS/A (figura 10). Este experimento aprovecha el hecho de que la doxorubicina es un compuesto fluorescente y de que la intensidad de la fluorescencia de las células tumorales, recuperadas de los animales tras el tratamiento, indica la cantidad de doxorubicina que ha penetrado en los tumores. El experimento se realizó en ratones *nu/nu* para reducir el efecto del IFN γ endógeno. Cuando los ratones portadores de tumor fueron tratados con NGR-TNF y, tras 2 h, con doxorubicina, no se apreció un aumento significativo de la doxorubicina en las células tumorales, en comparación con los controles sin tratar. Sin embargo, la administración de IFN γ en combinación con NGR-TNF aumentó la penetración de la doxorubicina en los tumores. Esto indica que IFN γ resulta de importancia fundamental para la penetración inducida por TNF de los fármacos quimioterapéuticos.

Los resultados de este estudio indican que el IFN γ endógeno resulta de importancia fundamental para la actividad sinérgica de NGR-TNF/doxorubicina y que el mIFN γ exógeno junto con NGR-mTNF inducen un efecto antitumoral más potente en los ratones inmunodeficientes e inmunocompetentes. Esta opinión resulta respaldada por las observaciones anteriores que consisten en a) un anticuerpo anti-IFN γ neutralizante inhibe notablemente la actividad sinérgica NGR-TNF/doxorubicina en los ratones inmunocompetentes y b) no se produce sinergia en los ratones que carecen del gen IFN γ (ratones IFN γ ^{-/-}).

Ya que los linfocitos T y las células NK son las fuentes principales del IFN γ en los ratones inmunocompetentes y que los ratones *nu/nu* atímicos carecen de los linfocitos T, los resultados anteriores indican de manera convincente que los linfocitos T son la principal fuente del IFN γ necesario para la actividad NGR-TNF/doxorubicina. De acuerdo con este planteamiento está el descubrimiento de que el IFN γ exógeno o endógeno (producido por células tumorales transfectadas con ADNc de IFN γ) restablece la actividad sinérgica NGR-TNF/doxorubicina en los ratones *nu/nu*.

Estos resultados indican un rol crucial para el IFN γ en el direccionamiento vascular tumoral con NGR-TNF y la doxorubicina.

La carencia de los efectos terapéuticos del IFN γ en combinación con la doxorubicina (sin NGR-TNF) indica que esta citocina muestra actividad sinérgica con NGR-TNF, y poca o ninguna con la doxorubicina. Considerando que los fármacos quimioterapéuticos deben atravesar la pared de los vasos y migrar a través del intersticio para alcanzar las células cancerosas, resulta muy probable que el sitio de acción de IFN γ y NGR-TNF sea el revestimiento endotelial de los vasos. Resulta bien conocido que el TNF puede inducir, en las células endoteliales, la alteración de la actina citoesquelética y la formación de los espacios intercelulares que comportan la permeabilidad aumentada a las macromoléculas. En las mismas células el TNF puede inducir las moléculas de adhesión leucocitaria, las citocinas proinflamatorias, el depósito de fibrina, la producción de óxido nítrico, y la apoptosis. Así, se descubrió que la permeabilidad *in vitro* de las monocapas celulares endoteliales a la peroxidasa de rábano picante fue potenciada mediante la exposición al TNF en combinación con IFN γ en comparación con el TNF solo. No se puede descartar que, en vista de los efectos diversos que TNF e IFN γ pueden ejercer sobre las células endoteliales, la alteración de la permeabilidad vascular *in vivo* pueda asimismo ser consecuencia de los efectos indirectos relacionados con la liberación local de otras moléculas inflamatorias importantes que afectan a la permeabilidad endotelial.

Estos descubrimientos pueden asimismo presentar otras implicaciones importantes. Varios estudios en modelos animales y en pacientes mostraron que el TNF puede afectar y dañar de manera selectiva a los vasos tumorales, pero no a los vasos asociados a los tejidos normales. Así, la micro- y macrovasculatura de los tumores, pero no la del tejido normal, se ha apreciado que resultan muy dañadas después de que se proporcionara a los pacientes una perfusión de miembro aislado con TNF en combinación con melfalán. La base molecular de esta selectividad no está clara. Se ha planteado como hipótesis que las diferencias estructurales en los vasos tumorales y/o la presencia de “factores de sensibilización” derivados de los tumores podrían ser responsables de la selectividad vascular de TNF. Los presentes resultados indican que la producción local de IFN γ podría ser uno de esos factores de sensibilización.

Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia a las formas de realización preferidas específicas, debe apreciarse que la invención reivindicada no está limitada a dichas formas de realización específicas. De hecho, resultarán evidentes diversas modificaciones de los modos de poner en práctica la invención a los expertos en biología molecular o los campos relacionados que están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

Referencias

1. **Carswell, E. A., et al.**, An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975. 72:3666-70.
2. **Helson, L., et al.**, Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature* 1975. 258:731-732.
3. **Tracey, K. J., and A. Cerami**. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1993. 9:317-43.
4. **Hoogenboom, H. R., et al.**, Construction and expression of antibody-tumor necrosis factor fusion proteins. *Mol. Immunol.* 1991. 28:1027-37.
5. **Loetscher, H., et al.**, Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75kDa TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 1993. 268:26350-7.
6. **Yang, J., et al.**, A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possesses the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. *Mol. Immunol.* 1995. 32:873-81.
7. **Van Ostade, X., et al.**, Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature* 1993. 361:266-9.
8. **Paganelli, G., et al.**, Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigenpositive patients. *Cancer Res.* 1991. 51:5960-6.
9. **Paganelli, G., et al.**, Clinical application of the avidin-biotin system for tumor targeting. In D. Goldenberg (Ed.) *Cancer therapy with radiolabeled antibodies*. *CRC Press, Boca Raton*, 1995. P. 239-253.
10. **Modorati, G., et al.**, Immunoscintigraphy with three step monoclonal pretargeting technique in diagnosis of uveal melanoma: preliminary results. *Br. J. Ophthalmol.* 1994. 78:19-23.

11. **Colombo, P., et al.**, Immunoscintigraphy with anti-chromogranin A antibodies in patients with endocrine/ neuroendocrine tumors. *J. Endocr. Invest.* 1993. 16:841-3.
12. **Debs, R. J., et al.**, Liposome-associated tumor necrosis factor retains bioactivity in the presence of neutralizing anti-tumor necrosis factor antibodies. *J. Immunol.* 1989. 143:1192-7.
13. **Debs, R. J., et al.**, Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor alpha in rats. *Cancer Res.* 1990. 50:375-80.
14. **Moro, M., et al.**, Tumor cell targeting with antibody-avidin complexes and biotinylated tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 1997. 57:1922-8.
15. **Schraffordt Koops, et al.**, Hyperthermic isolated limb perfusion with tumour necrosis factor and melphalan as treatment of locally advanced or recurrent soft tissue sarcomas of the extremities. *Radiotherapy & Oncology* 1998. 48:1-4.
16. **Lienard, D., et al.**, In transit metastases of malignant melanoma treated by high dose rTNF alpha in combination with interferon-gamma and melphalan in isolation perfusion. *World Journal of Surgery* 1992. 16:234-40.
17. **Hill, S., et al.**, Low-dose tumour necrosis factor alpha and melphalan in hyperthermic isolated limb perfusion. *Br. J. Surg.* 1993. 80:995-7.
18. **Eggermont, A. M., et al.**, Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann. Surg.* 1996. 224:756-65.
19. **Mizuguchi, H., et al.**, Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the *in vivo* transfer of genes into the artery that leads to tumor. *Cancer Res.* 1998. 58:5725-30.
20. **Pennica, D., et al.**, Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985. 82:6060-4.
21. **Corti, A., et al.**, Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha: Structure activity relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells. *Cancer Res.* 1998. 58:3866-3872.
22. **Corti, A., et al.**, Up-regulation of p75 Tumor Necrosis Factor alpha receptor in Mycobacterium avium-infected mice. *Infect. Immun.* 1999, 67:5762-5767.
23. **Corti, A., et al.**, Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF alphasoluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. *J. Immunol. Meth.* 1994. 177:191-198.
24. **Ljunggren, H. G., and K. Karre.** Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 1985. 162:1745-59.
25. **Celik, C., et al.**, Demonstration of immunogenicity with the poorly immunogenic B16 melanoma. *Cancer Res.* 1983. 43:3507-10.
26. **Gasparri, A., et al.**, Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. *Cancer Res.* 1999. 59:2917-23.
27. **Palladino, M. A., Jr., et al.**, Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J. Immunol.* 1987. 138:4023-32.
28. **Arap, W., et al.**, Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998. 279:377-80.
29. **Fiers, W.** Biologic therapy with TNF: preclinical studies. In V. De Vita, S. Hellman, and S. Rosenberg Eds). *Biologic therapy of cancer: principles and practice*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1995. P. 295-327.
30. **Rathjen, D. A., et al.**, 1992. Selective enhancement of the tumour necrotic activity of TNF alpha with monoclonal antibody. *Brit. J. Cancer* 65:852.
31. **Robert, B., et al.**, 1996. Cytokine targeting in tumors using a bispecific antibody directed against carcinoembryonic antigen and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 56:4758.

ES 2 326 530 T3

32. **Fraker, D.L., Alexander, H.R. & Pass, H.I., 1995.** Biologic therapy with TNF: systemic administration and isolationperfusion. In *Biologic therapy of cancer: principles and practice*, De Vita, V., Hellman, S. & Rosenberg, S. (eds) páginas 329-345. J.B. Lippincott Company: Philadelphia.

5 33. **Pennica, D., et al., 1984.** Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 321, 724-729.

34. **Curnis, F., Sacchi, A., Borgna, L., Magni, F., Gasparri, A., y Corti, A. (2000).** *Nat. Biotechnol.* 18, 1185-90.

10 35. **Curnis, F., Sacchi, A., y Corti, A. (2002).** *Journal of Clinical Investigation*, 110: 475-82.

36. **Gasparri, A., Moro, M., Curnis, F., Sacchi, A., Pagano, S., Veglia, F., Casorati, G., Siccardi, A. G., Dellabona, P., y Corti, A. (1999).** *Cancer Research* 59, 2917-23.

15 37. **Moro, M., Pelagi, M., Fulci, G., Paganelli, G., Dellabona, P., Casorati, G., Siccardi, A. G., y Corti, A. (1997).**

20 38. **Smith, R. A., y Baglioni, C. (1987).** *Journal of Biological Chemistry* 262, 6951-4.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 326 530 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un producto de conjugación de TNF y un péptido que contiene el motivo NGR o un polinucleótido para su codificación, y una cantidad eficaz de IFN γ o un polinucleótido para su codificación.
2. Composición según la reivindicación 1, junto con los portadores y los excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho TNF es TNF α o TNF β .
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho péptido se selecciona de entre el grupo constituido por CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, ciclo CVLNGRM ϵ C, CNGRC lineal y CNGRC cíclico.
- 15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el TNF está unido al péptido mediante un espaciador.
- 20 6. Composición según la reivindicación 5, en la que dicho péptido es CNGRC lineal o cíclico y en la que el amino terminal de TNF está unido a CNGRC mediante el espaciador G.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el TNF se modifica con polietilenglicol o un resto acilo.
- 25 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el TNF está conjugado además con un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y biotina, en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo está dirigido contra un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por un antígeno tumoral, un marcador angiogénico tumoral o un componente de la matriz extracelular.
- 30 9. Composición según la reivindicación 8, en la que el TNF está conjugado a un péptido que contiene el motivo NGR y a un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y biotina.
- 35 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de solución o suspensión inyectable o un líquido para infusiones.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en forma de liposomas.
- 40 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además otro agente antitumoral o un compuesto para el diagnóstico por imagen del tumor.
13. Composición según la reivindicación 12, en la que el otro agente antitumoral es la doxorrubicina.
- 45 14. Utilización de una cantidad eficaz de un producto de conjugación de TNF y un péptido que contiene el motivo NGR o un polinucleótido para su codificación, y una cantidad eficaz de IFN γ o un polinucleótido para su codificación, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o al diagnóstico de un paciente de cáncer.
15. Utilización según la reivindicación 14, que comprende además administrar otros agentes antitumorales o compuestos para el diagnóstico por imagen del tumor.
- 50 16. Utilización según la reivindicación 14 ó 15, en la que el producto de conjugación es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9.
- 55 17. Productos que comprenden una cantidad eficaz de un producto de conjugación de TNF y el péptido que contiene el motivo NGR o un polinucleótido para su codificación, y una cantidad eficaz de IFN γ o un polinucleótido para su codificación, para su utilización terapéutica en administración combinada, separada o secuencial.
- 60 18. Productos para su utilización según la reivindicación 17, en los que el producto de conjugación es como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9.
- 65

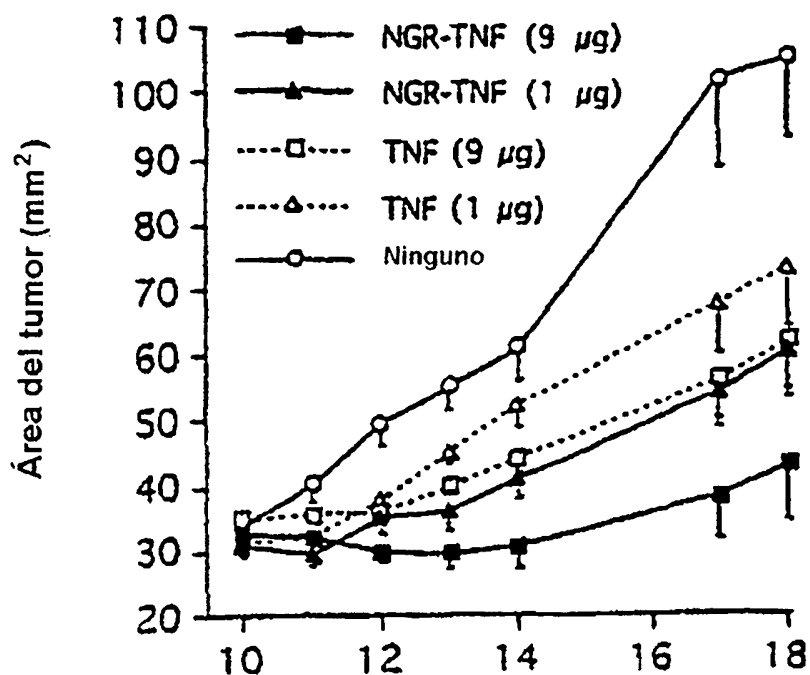


Fig. 1a

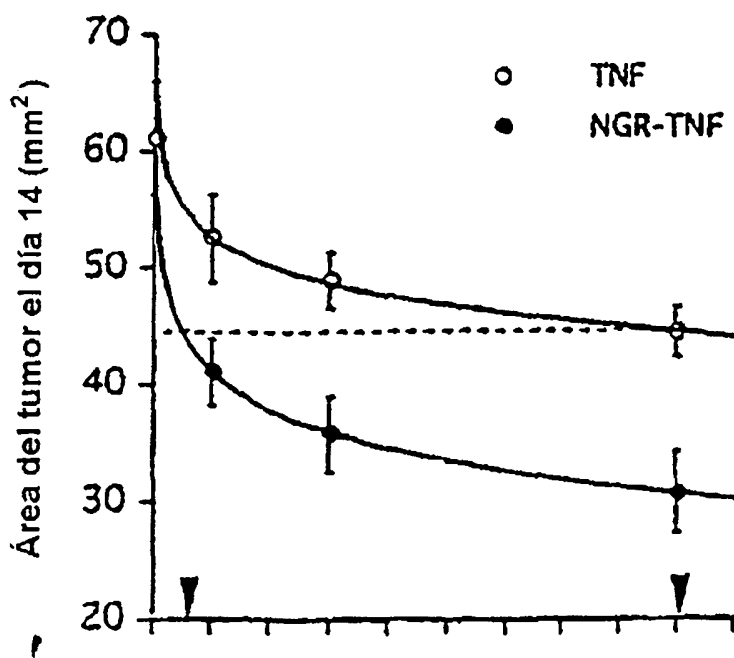


Fig. 1b

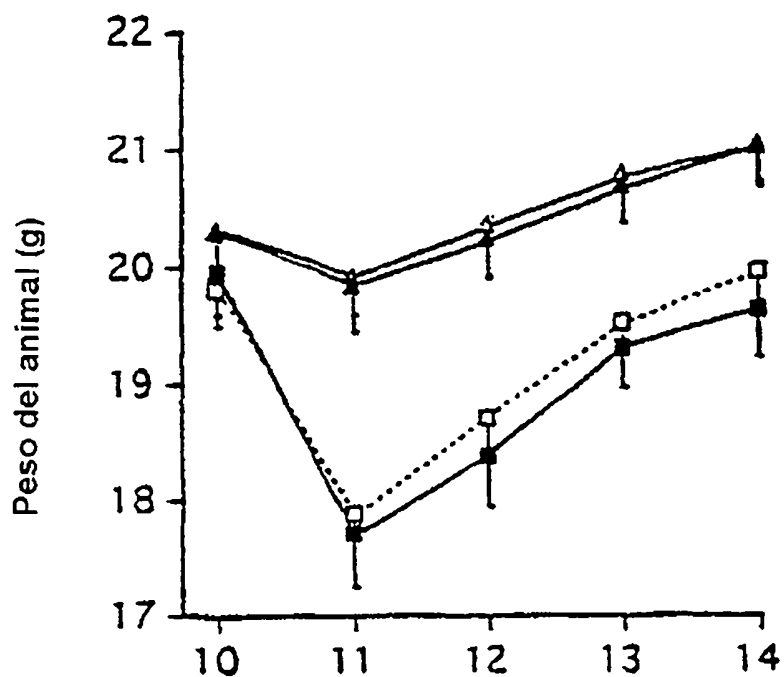


Fig. 1c

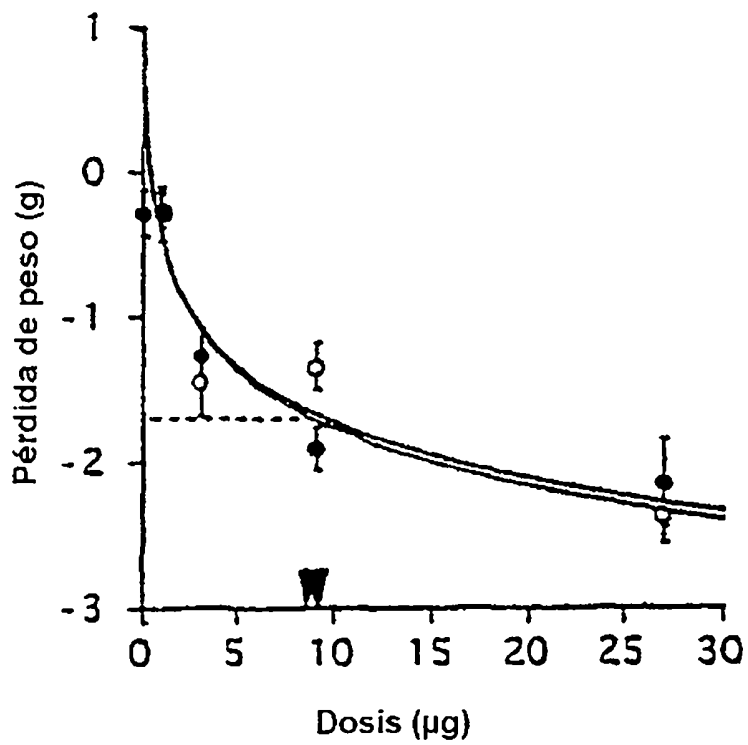


Fig. 1d

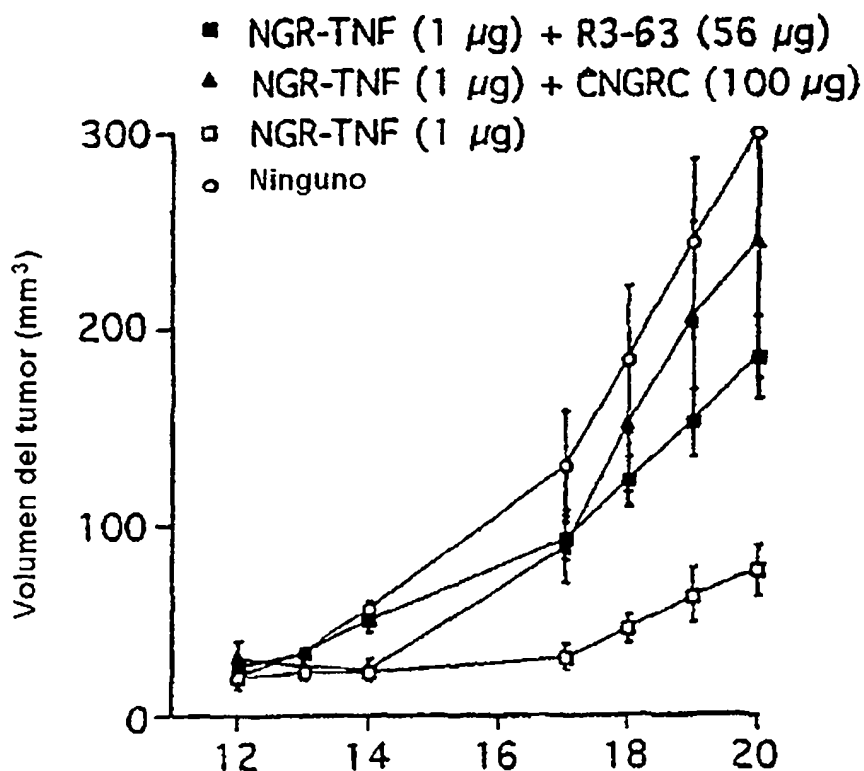


Fig. 2a

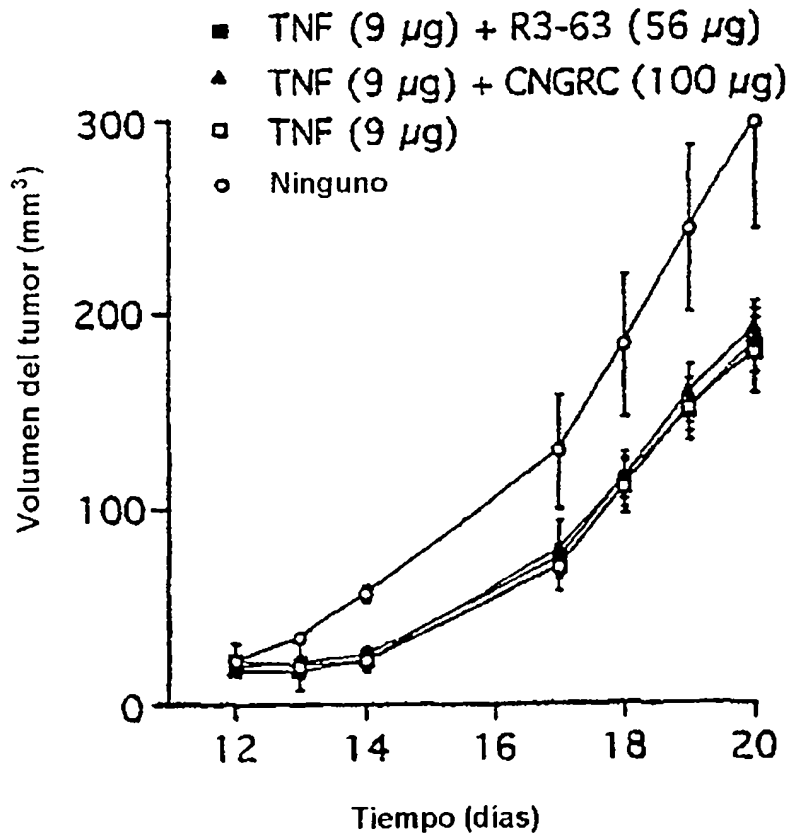


Fig. 2b

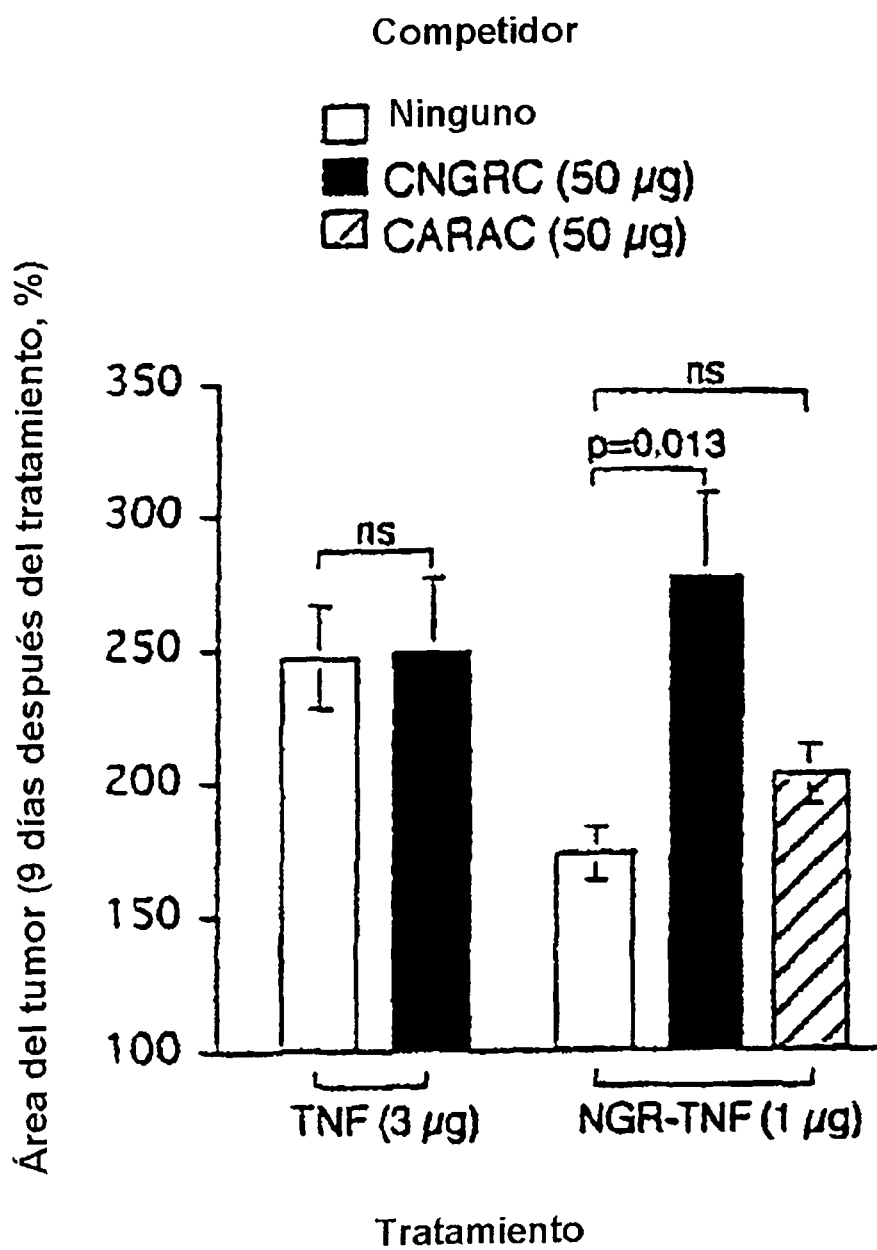


Fig. 2c

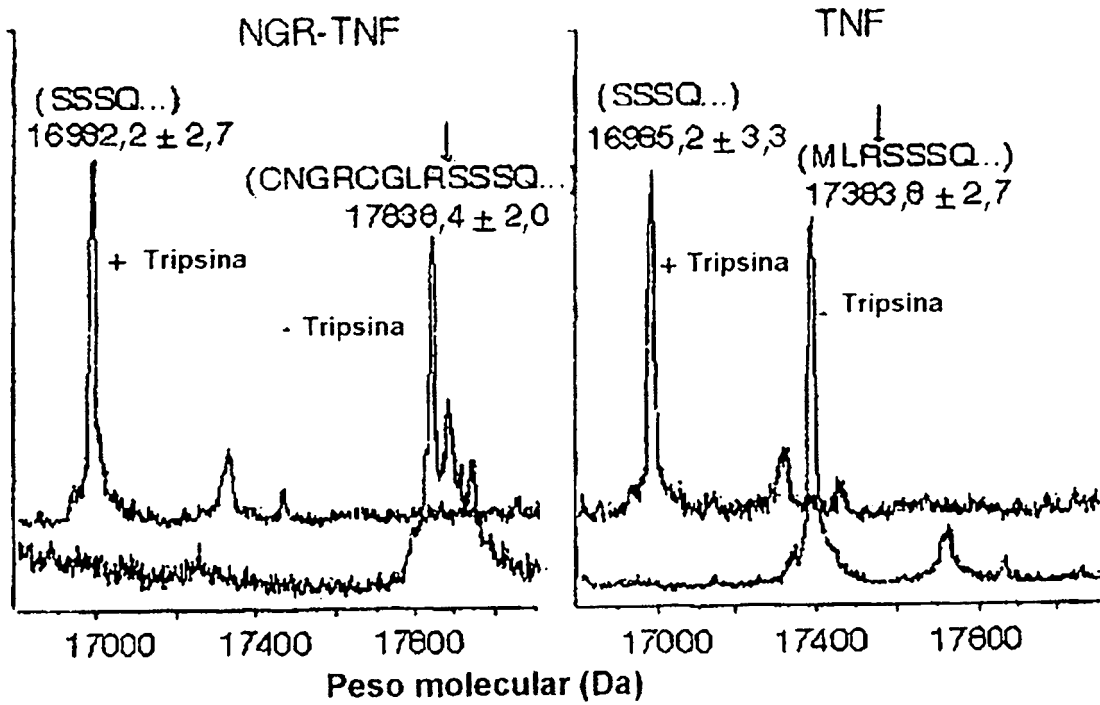


Fig. 3a

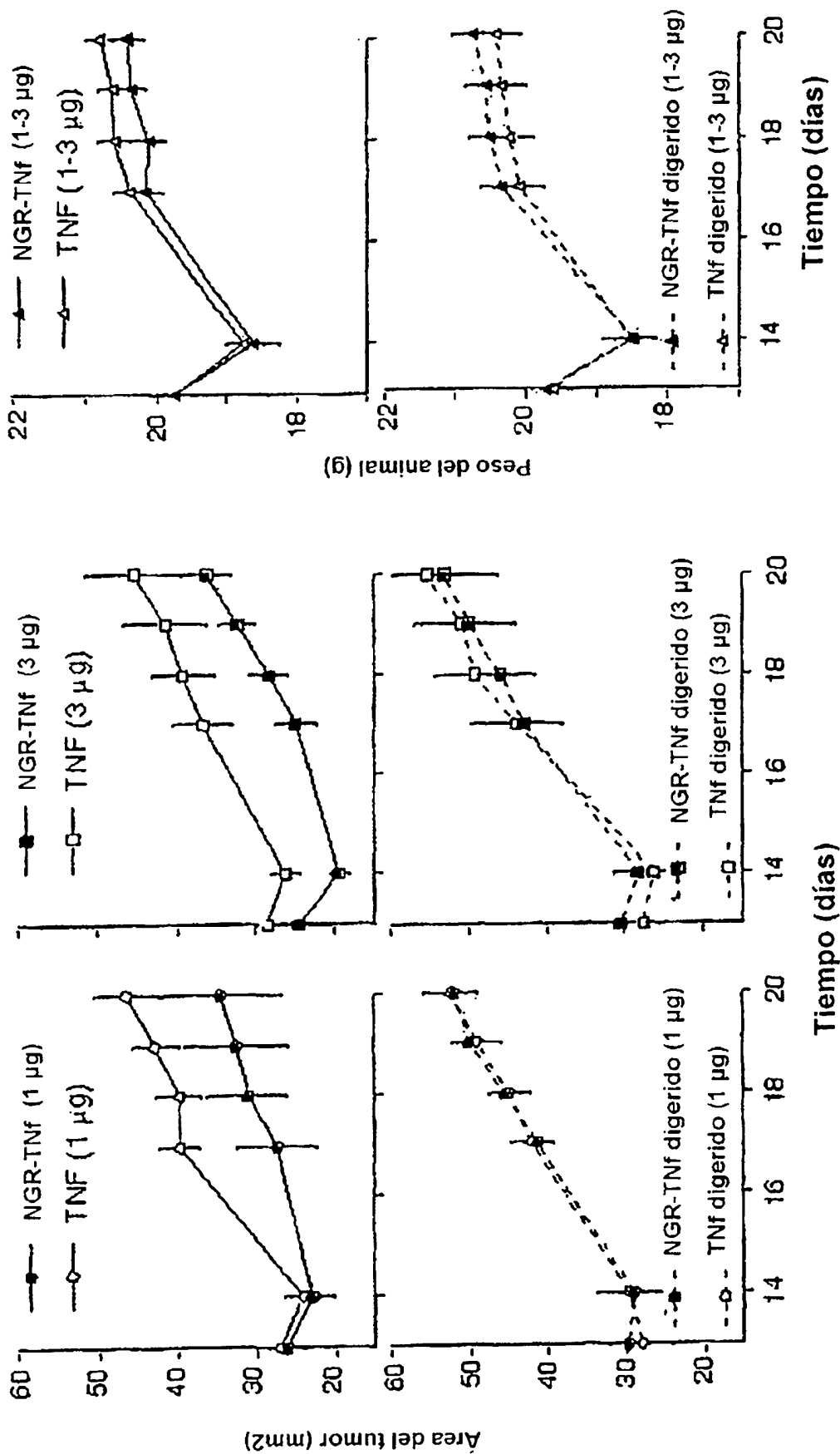


Fig. 3b

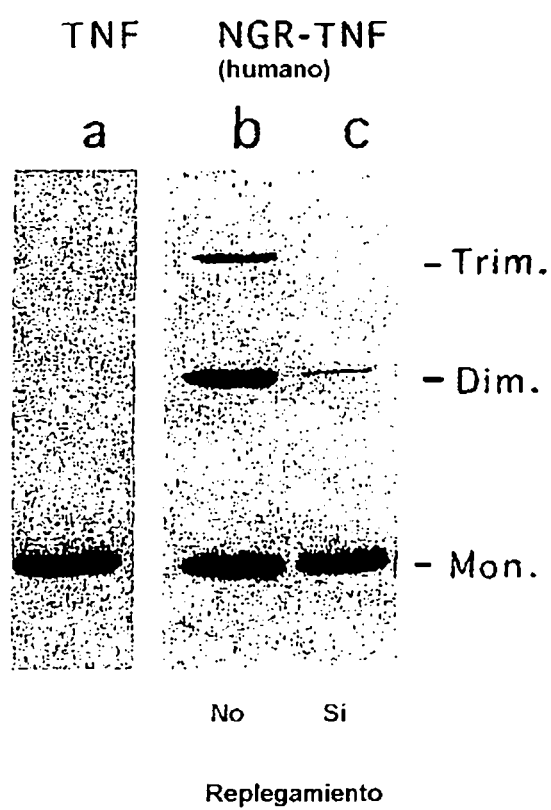


Fig. 4a

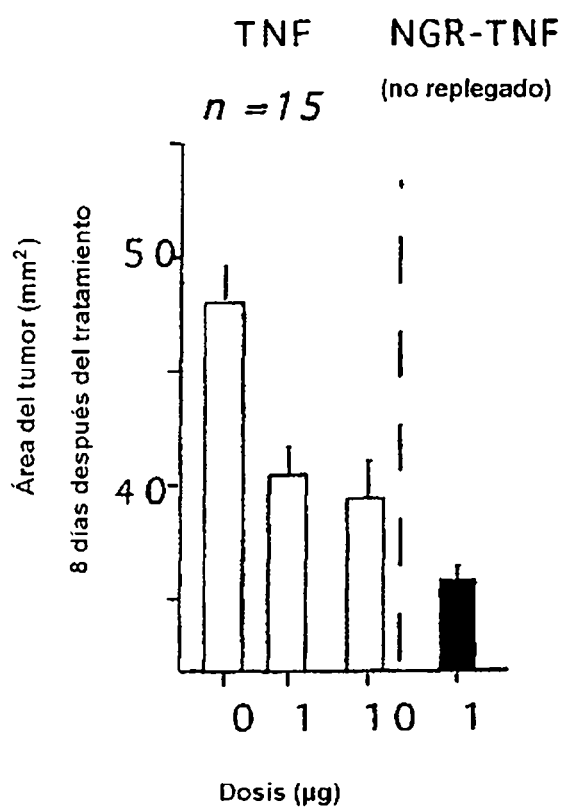


Fig. 4b

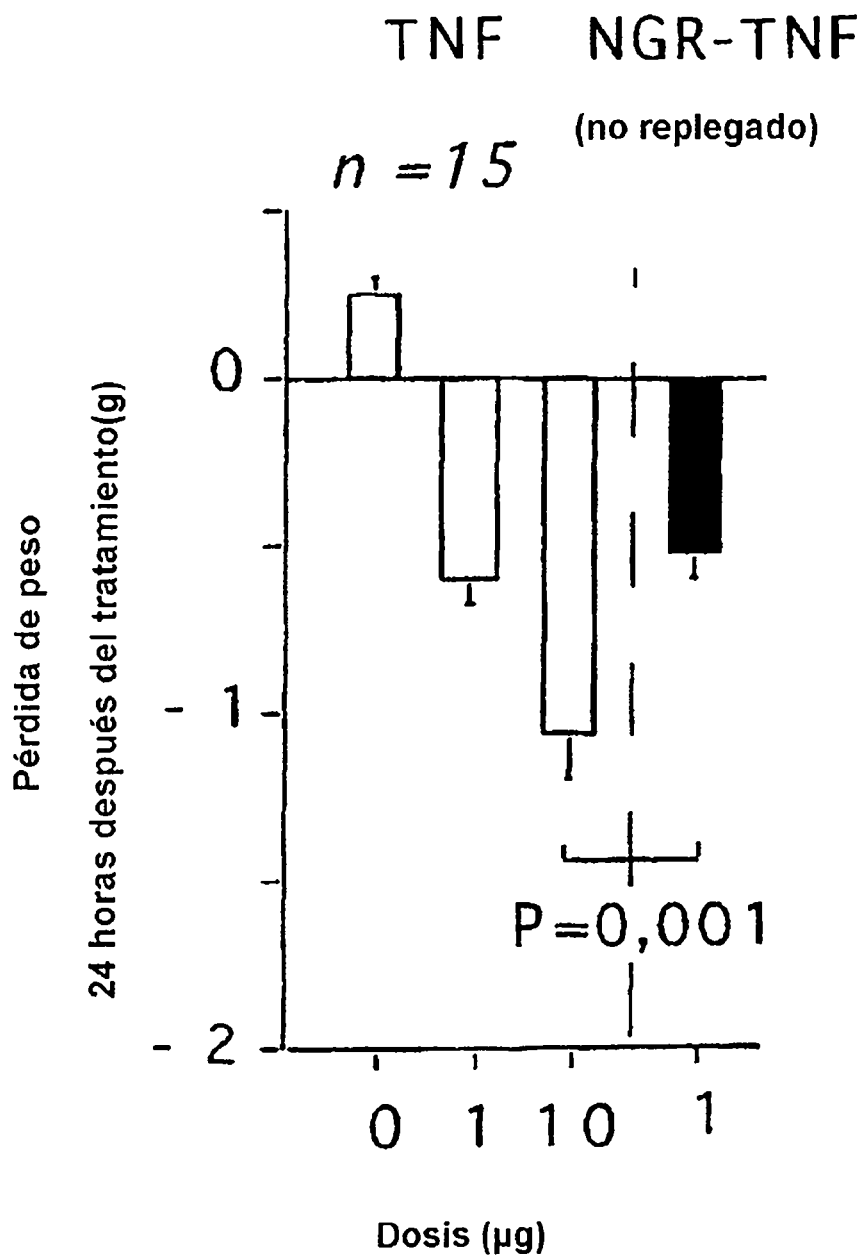


Fig. 4c

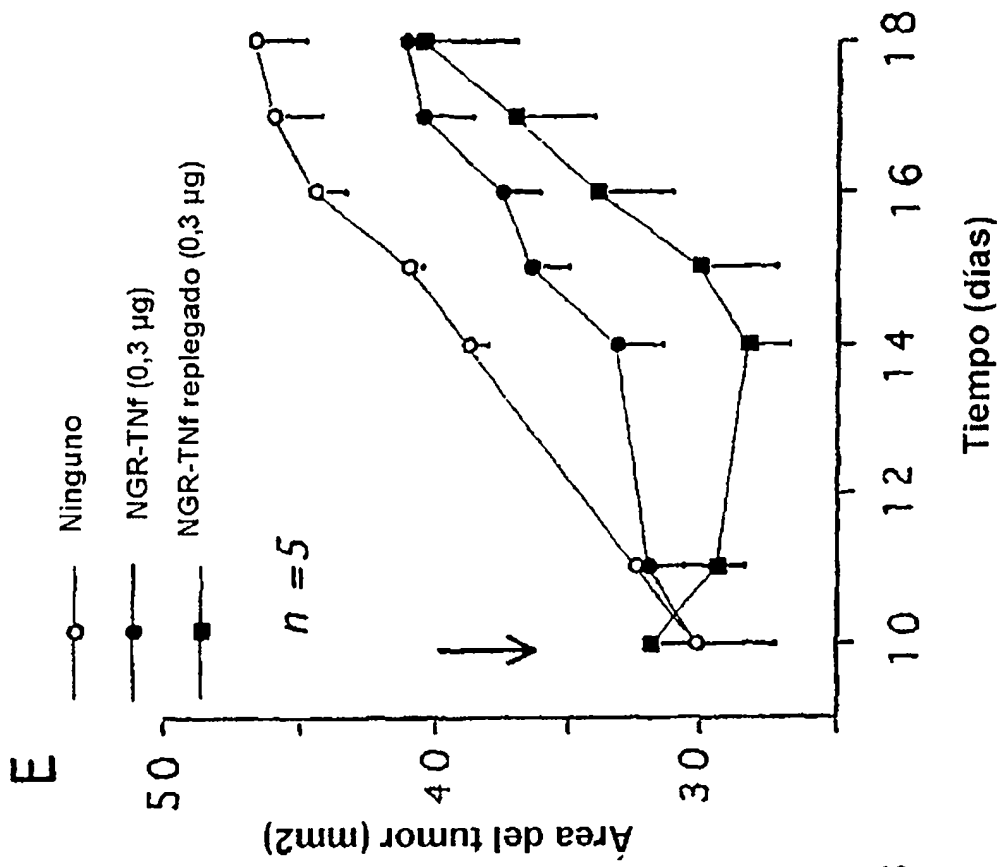


Fig. 4e

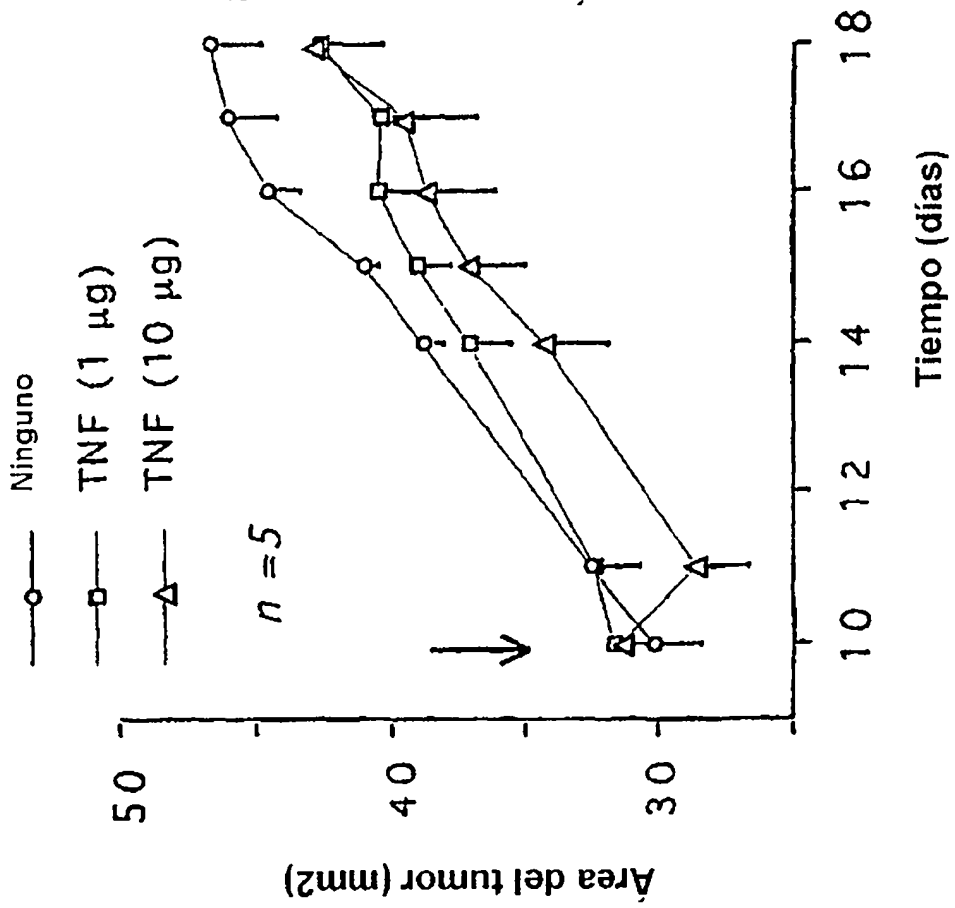


Fig. 4d

Efecto de un anticuerpo anti-m IFNy (AN18) sobre la actividad antitumoral de NGR-m IFNy y la doxorubicina en los tumores B16F1 en los ratones C57BL6

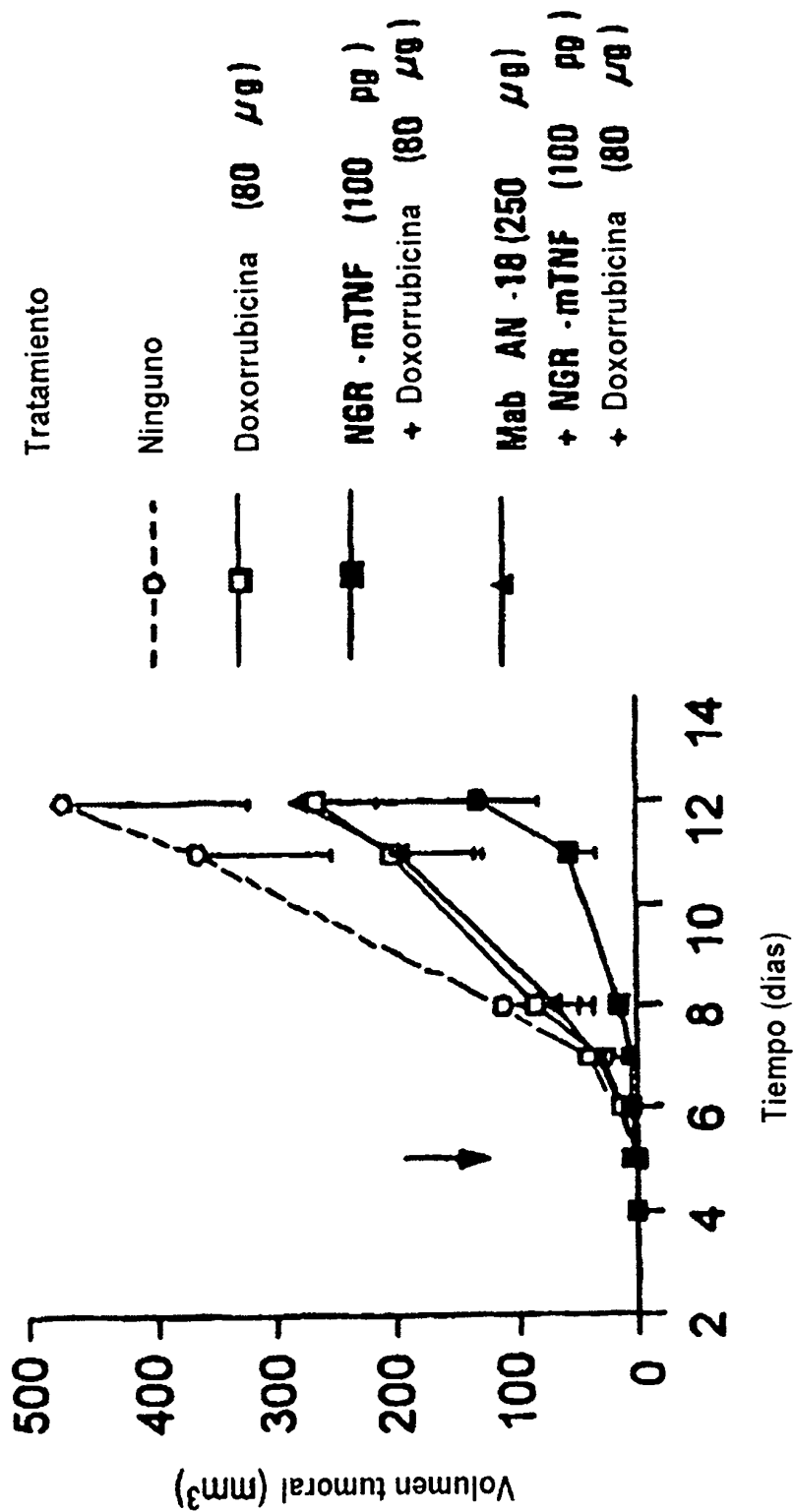


Fig. 5

Efecto de NGR-TNF y doxorrubicina en los ratones con inactivación génica de IFN γ

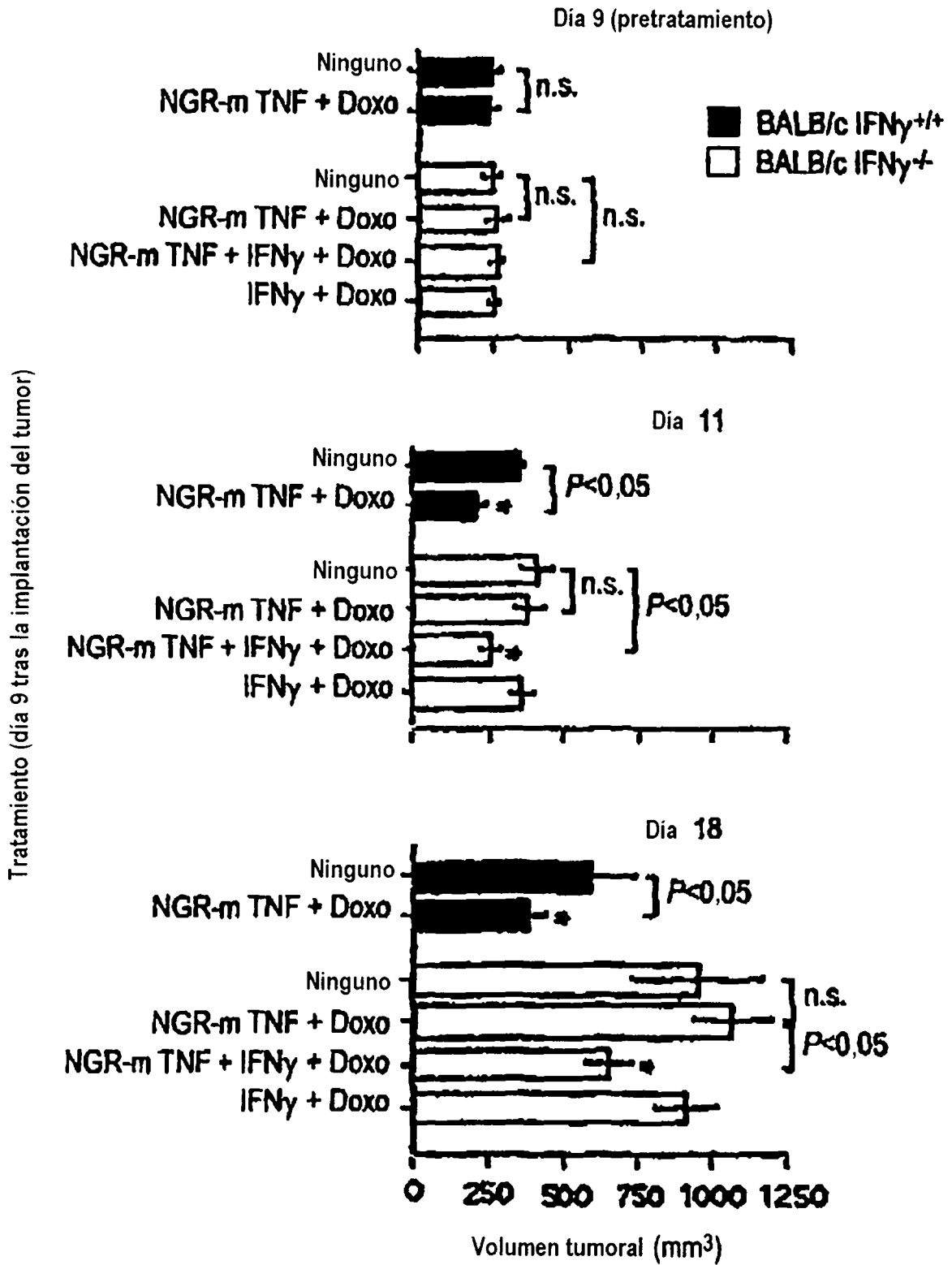


Fig. 6

Efecto de NGR-m TNF, m IFN γ y la doxorubicina (solos o en combinación) sobre los tumores B16F1 en ratones desnudos

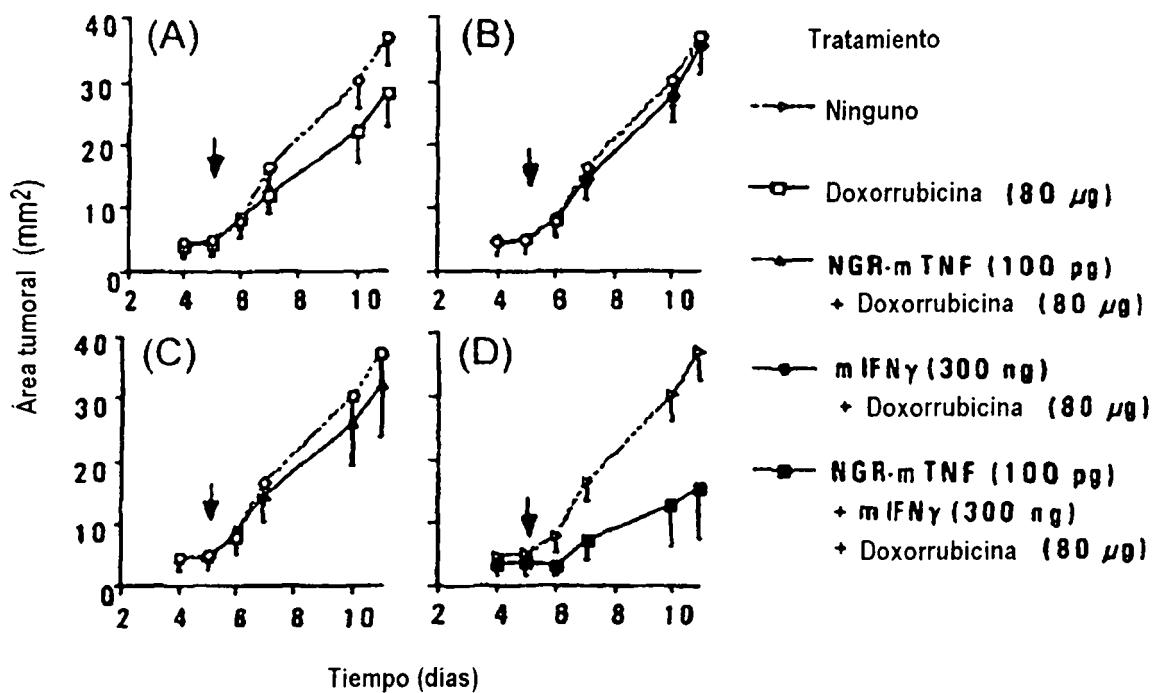


Fig. 7

Efecto de NGR-TNF y la doxorrubicina en ratones desnudos

nu/nu BALB/c

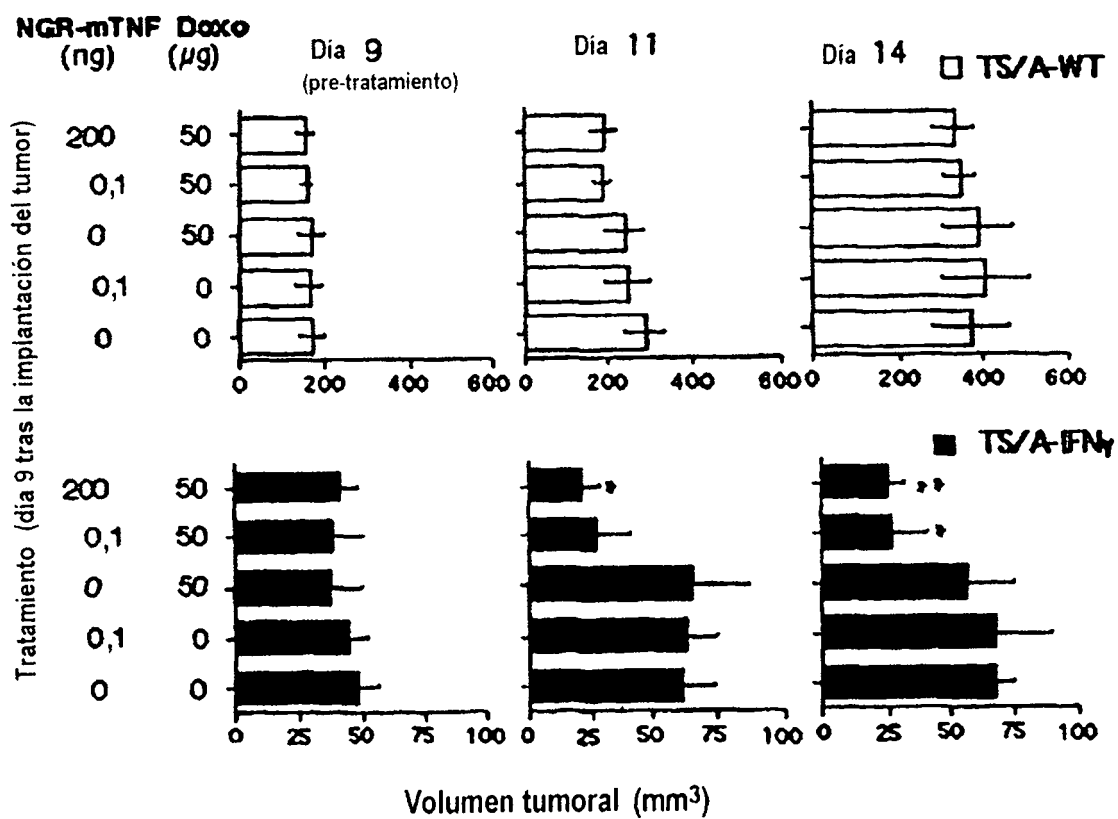


Fig. 8

Efecto de NGR-m, TNF, mIFN γ y la doxorubicina en los tumores B16F1 en ratones inmunocompetentes (C57BL6)

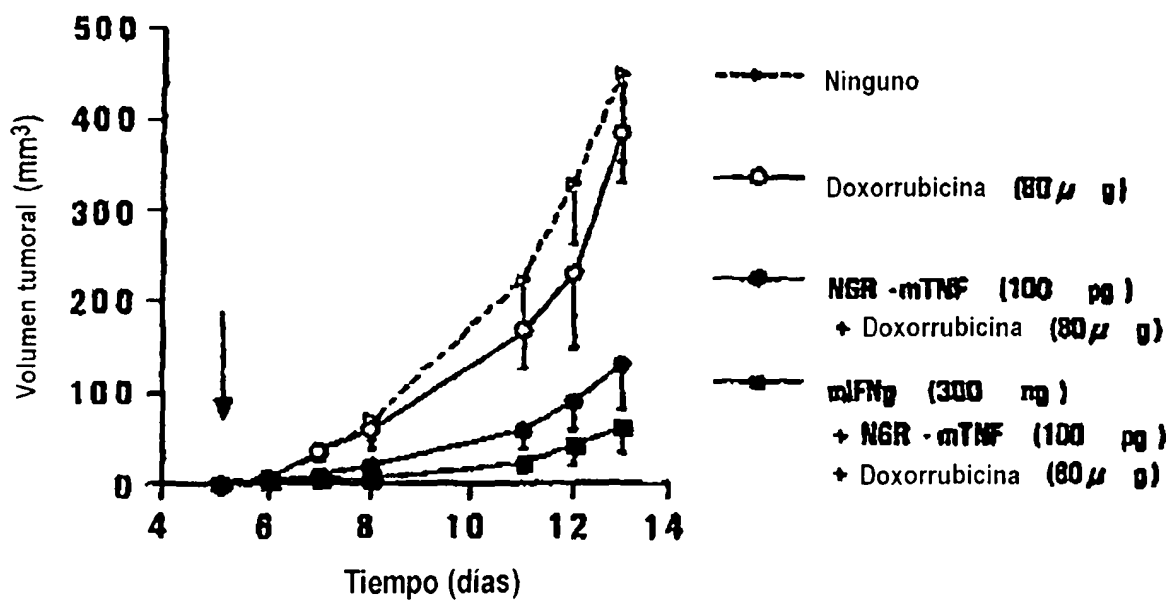


Fig. 9

IFN γ aumenta la penetración de doxorrubicina en tumores cuando se combina con NGR-TNF en ratones con inactivación génica de IFN γ

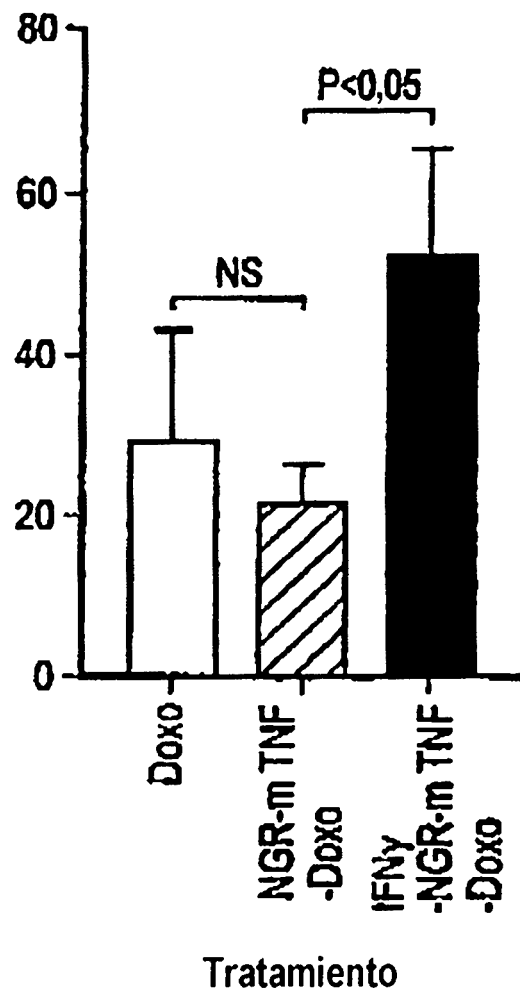


Fig. 10

ES 2 326 530 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor
- 5 <120> Citocinas modificadas para su utilización en la terapia del cáncer
- <130> modcyt
- 10 <140>
- <141>
- <160> 7
- 15 <170> Patente en versión 2.1
- <210> 1
- 20 <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para PCR
- <400> 1
- 30
- ctggatcctc acagagcaat gactccaaag 30
- <210> 2
- 35 <211> 29
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para PCR
- <400> 2
- 45
- tgctcacat atgetcagat catcttctc 29
- <210> 3
- 50 <211> 46
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para PCR
- <400> 3
- 60
- gcagatcata tgtgcaacgg ccgttgcggc ctcagatcat ctctc 46
- <210> 4
- 65 <211> 45
- <212> ADN

ES 2 326 530 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para PCR

<400> 4

10 **atatcatatg tgcaacggcc gttgcggcgt cagatcatct tctcg** 45

<210> 5

<211> 36

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para PCR

<400> 5

25 **tcaggatcct cacagggcaa tgatccaaa gtagac** 36

<210> 6

<211> 35

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para PCR

<400> 6

40 **atatctacat atgcacggca cagtcattga aagcc** 35

<210> 7

<211> 58

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador para PCR

<400> 7

55 **tccgatcctc agcaacggcc gttgcagccg gagcgactcc ttttccgctt**
 cttgaggc 58

60

65