



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 361**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07K 14/525** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 14/57** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01914085 .4**

86 Fecha de presentación : **22.02.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1257297**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.11.2002**

54

Título: **Composiciones y métodos para tratamiento de la angiogénesis en lesiones patológicas.**

30

Prioridad: **24.02.2000 US 184767 P**  
**21.12.2000 US 257192 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2007**

73

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

72

Inventor/es: **Zardi, L.;**  
**Neri, D.;**  
**Carnemolla, Barbara;**  
**Nilsson, F.;**  
**Tarli, L.;**  
**Borsi, Laura y**  
**Halin, C.**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 269 361 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

Composiciones y métodos para tratamiento de la angiogénesis en lesiones patológicas.

5 La presente invención se refiere al tratamiento de lesiones de angiogénesis patológica, especialmente tumores. Aspectos de la presente invención emplean un conjugado o fusión de interleuquina-2 (IL-2) y un anticuerpo dirigido contra fibronectina ED-B, especialmente con el anticuerpo L19 (véase más adelante).

10 Los tumores no pueden crecer más allá de cierta masa sin la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y se ha consignado una correlación entre la densidad de microvasos y la invasividad de los tumores para diversos tumores (1). Las moléculas capaces de direccionar selectivamente marcadores de angiogénesis crean oportunidades clínicas para el diagnóstico y la terapia de tumores y otras enfermedades caracterizadas por proliferación vascular, tales como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad (2-8).

15 El dominio de fibronectina ED-B, una secuencia de 91 aminoácidos idénticos en ratones, ratas y humanos, que se inserta por corte y empalme alternativos en la molécula de fibronectina, se acumula específicamente alrededor de estructuras neovasculares y representa una diana para intervención molecular (9-11). Utilizando un anticuerpo humano recombinante (L19 para el dominio ED-B se ha demostrado la posibilidad de direccionamiento de neovasculatura *in vivo* en diferentes modelos de tumor (12, 13).

20 El pretratamiento de ratones portadores de tumores con un conjugado IL-2-anticuerpo anti-fibronectina dio como resultado una mayor absorción del agente anti-cáncer TNT (Epstein *et al.* (1995), Cancer Research, vol. 55, p. 2673-2680).

25 La presente invención está basada en el trabajo experimental de los inventores empleando un anticuerpo dirigido contra el dominio de fibronectina ED-B, encontrado en angiogénesis en lesiones patológicas tales como tumores, conjugado con moléculas que ejercen efectos biocidas o citotóxicos sobre células diana, específicamente interleuquina-2 (IL-2).

30 La interleuquina-2 (IL-2), una citoquina con 4 haces de hélice  $\alpha$  producida por las células T adyuvantes 1, juega un papel esencial en las fases de activación de las respuestas inmunitarias tanto específicas como naturales (14). IL-2 promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos activados T y B y de las células agresoras naturales (NK), e induce la actividad de las células T citotóxicas (CTL) y citotoxicidad antitumor NK/agresor activado por linfoquinas (LAK). IL-2 se ha utilizado en métodos inmunoterapéuticos para varios tumores humanos (15). La administración de IL-2 recombinante (rIL2) sola o en combinación con células linfoides transferidas por adopción ha dado como resultado la regresión de tumores establecidos tanto en modelos animales como en pacientes. Sin embargo, su eficacia terapéutica *in vivo* está limitada por su aclaramiento rápido y, a dosis elevadas, por una toxicidad severa relacionada principalmente con el síndrome de fuga vascular (16). El suministro de IL-2 al sitio del tumor por medio de un anticuerpo dirigido contra un marcador tumoral de la superficie celular puede permitir alcanzar concentraciones locales activas de IL-2, reduciendo al mismo tiempo las toxicidades asociadas con la administración sistémica (17).

45 La presente invención diverge de una manera nueva y no evidente de la técnica anterior citada por conjugar IL-2 con un anticuerpo dirigido a fibronectina ED-B. Como se ha indicado, en los intentos de la técnica anterior para emplear IL-2 en el tratamiento de tumores por suministro utilizando un anticuerpo, el anticuerpo ha estado dirigido contra un marcador tumoral de la superficie celular. Sin embargo, las células tumorales presentan una gran heterogeneidad en la expresión de marcadores tumorales de la superficie celular, y pueden estar reguladas en sentido decreciente durante las terapias.

50 La presencia de IL-2 unida a la superficie de una célula tumoral da como resultado la activación y/o el direccionamiento de células efectoras del sistema inmunitario, sean células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> o células agresoras naturales (NK), y la inducción de una respuesta inmunitaria anti-tumoral eficiente. Las células T o NK reciben una señal a través de uno o más receptores (por ejemplo el receptor de las células T en el caso de las células T) que reconoce(n) específicamente ligandos apropiados en la superficie de las células tumorales, y una segunda señal a través de cadenas receptoras de IL-2 por IL-2, localizadas también en la superficie de las células tumorales (Lode *et al.*, 1999, *PNAS USA*, 96: 8591-8596 y las referencias citadas en dicho lugar).

55 De modo diferente, en los experimentos descritos con mayor detalle más adelante, los autores de la invención construyeron y expresaron en células de mamífero una proteína de fusión anticuerpo-IL2, estando dirigido el anticuerpo (L19, cuya secuencia se describe en Pini *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 21769-21776) contra un componente de la matriz extracelular presente en la angiogénesis en lesiones patológicas (en particular fibronectina ED-B). Experimentos de biodistribución *in vivo* en ratones portadores de tumores demostraron la acumulación de la proteína de fusión alrededor de vasos sanguíneos en tumores de nueva formación. La proteína de fusión se ensayó en experimentos terapéuticos en animales portadores de tumores y se encontró sorprendentemente que induce un efecto anti-tumoral y es significativamente más activa en la reducción del crecimiento tumoral que una mezcla equimolecular de L19 e IL-2.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra una representación esquemática del constructo scFv L19-IL2 cDNA. scFv L19 e IL2 cDNA se fusionaron genéticamente con un enlazador de DNA (--) que codificaba 15 aminoácidos (SSSSG)<sub>3</sub> y se clonaron en el vector de expresión de mamífero pcDNA3 utilizando los sitios de restricción HindIII y BamHI. El recuadro rayado representa la secuencia promotora CMV, el recuadro lleno la secuencia genómica del péptido señal conductor de secreción (intrón **447-25**) dentro de la secuencia genómica) y los recuadros vacíos el VH o VL de la secuencia scFV-L19 e IL2. T7, BC666, BC679 y BC695 son iniciadores utilizados en las amplificaciones PCR descritas en Materiales y Métodos.

La Figura 2 muestra la actividad biológica de la porción IL2 de la proteína de fusión (○) y de IL2 contenida en una mezcla de concentraciones equimolares de L19 y IL2 (●) medida por la proliferación de células CTLL.

La Figura 3 muestra los resultados de un análisis de biodistribución realizado en ratones portadores de un teratocarcinoma murino F9 implantado subcutáneamente, inyectados por vía intravenosa con scFv(L19)-TF radiodado.

La referencia en esta memoria a la molécula biocida o citotóxica es una referencia a interleuquina 2.

La presente invención proporciona la materia que constituye el objeto de las reivindicaciones.

Un conjugado empleado en la invención comprende preferiblemente una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y un denominado miembro de fijación específica, o bien, en el caso en que el miembro de fijación específica es bicatenario o multicatenario, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y un componente de cadena polipeptídica de dicho miembro de fijación específica. Preferiblemente, el miembro de fijación específica es un polipéptido monocatenario, v.g. una molécula de anticuerpo monocatenario, tal como scFv. Así, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y una molécula de anticuerpo monocatenario Fv específica para fibronectina ED-B.

Como se expone adicionalmente más adelante, el miembro de fijación específica es preferiblemente un anticuerpo o comprende un sitio de fijación anticuerpo-antígeno. Convenientemente, el miembro de fijación específica puede ser un polipéptido monocatenario, tal como un anticuerpo monocatenario. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende anticuerpo monocatenario y la molécula biocida o citotóxica, es decir, interleuquina-2. En otras realizaciones, se proporciona un sitio de fijación anticuerpo-antígeno por medio de asociación de un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL en polipéptidos separados, v.g. en un anticuerpo completo o en un fragmento de anticuerpo tal como Fab o diacuerpo. En el caso en que el miembro de fijación específica es una molécula bicatenaria o multicateneria (v.g. Fab o anticuerpo completo, respectivamente), la molécula biocida o citotóxica puede estar conjugada como un polipéptido de fusión con una o más cadenas de polipéptido en el miembro de fijación específica.

Un sitio de fijación anticuerpo-antígeno utilizado en un miembro de fijación específica de acuerdo con la presente invención puede incluir los dominios VH y/o VL del anticuerpo L19 o un anticuerpo que compite con L19 para fijarse a ED-B. Las secuencias de los dominios L19 VH y L19 VL se describen en Pini *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 21769-21776).

Otros miembros de fijación específica distintos de anticuerpos que pueden conjugarse con IL-2 y utilizarse de acuerdo con la presente invención incluyen péptidos, aptámeros y pequeñas moléculas orgánicas capaces de interactuar con un componente del ECM asociado con lesiones patológicas.

Como se ha indicado, preferiblemente el miembro de fijación específica está conjugado con la molécula biocida o citotóxica por medio de un enlace peptídico, es decir dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el miembro de fijación específica o un componente de cadena polipeptídica del mismo. Véase Taniguchi *et al.* (1983) *Nature* 302, 305-310; Maeda *et al.* (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 1090-1097; Devos *et al.* (1983) *Nucl. Acids Res.* 11: 4307-4323 para información de la secuencia de IL-2 útil en la preparación de un polipéptido de fusión que comprende IL-2. otros medios para conjugación incluyen conjugación química, especialmente reticulación utilizando un reactivo bifuncional (v.g. empleando ADOUBLE-REAGENTS™@Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

La lesión tratada puede ser un tumor, incluyendo sin limitación uno cualquiera o más de los siguientes: melanoma, neuroblastoma, carcinoma colorrectal, carcinoma renal, carcinoma de pulmón, metástasis pulmonares, carcinoma de mama, astrocitoma de grado alto (grado III, grado IV), meningioma y angioma.

La lesión puede ser ocular, v.g. procedente de la degeneración macular relacionada con la edad, en la cual la angiogénesis proviene de vasos coroides.

*Miembro de fijación específica*

Este término describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de fijación recíproca. Los miembros de un par de fijación específica pueden derivarse naturalmente o producirse total o parcialmente por síntesis.

5 Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se fija específicamente a y es por consiguiente complementaria para una organización particular espacial y polar del otro miembro del par de moléculas. Así, los miembros del par tienen la propiedad de fijarse específicamente uno a otro.

*Anticuerpo*

10 Este término describe una inmunoglobulina que puede ser natural o producirse parcial o totalmente por síntesis. El término abarca también cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de fijación que es, o es sustancialmente homólogo a, un dominio de fijación anticuerpo-antígeno. Éstos pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse parcial o totalmente por síntesis. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de fijación de antígeno tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.

20 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y de otras clases y utilizar técnicas de la tecnología del DNA recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de DNA que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), de un anticuerpo para las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de entramado, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Un hibridoma u otra célula productora de un anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de fijación de los anticuerpos producidos.

25 Dado que los anticuerpos pueden modificarse de diversas maneras, el término "anticuerpo" debe interpretarse en el sentido de abarcar cualquier miembro de fijación específica que tenga un dominio de anticuerpo de fijación de antígeno que fija el dominio con la especificidad requerida. Así, este término abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, con inclusión de cualquier polipéptido que comprenda un dominio de fijación de inmunoglobulina, sea natural o total o parcialmente sintético. Por consiguiente, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de fijación de inmunoglobulina, o equivalente, fusionadas a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

35 Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo entero pueden realizar la función de fijación de antígeno. Ejemplos de fragmentos de fijación son (i) el fragmento Fab constituido por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd constituido por los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv constituido por los dominios VL y VH de un anticuerpo simple; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)) que está constituido por un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; (vii) moléculas monocatenarias Fv (scFv), en las cuales un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de fijación de antígeno (Bird *et al.*, Science, **242**, 423-426, 1988; Huston *et al.*, PNAS USA, **85**, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros biespecíficos monocatenarios Fv (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión de genes (WO94/13804; P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 6444-6448, 1993). Fv, scFv o las moléculas de diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Y. Reiter *et al.*, Nature Biotech, **14**, 1239-1245, 1996). También pueden producirse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (S. Hu *et al.*, Cancer Res., **56**, 3055-3061, 1996).

*Dominio de fijación de antígeno*

50 Este término describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que se fija específicamente a y es complementaria para parte o la totalidad de un antígeno. En los casos en que un antígeno es de gran tamaño, un anticuerpo puede fijarse sólo a una parte particular del antígeno, parte que se denomina un epítipo. Un dominio de fijación de antígeno puede estar proporcionado por uno o más dominios variables del anticuerpo (v.g. un denominado fragmento de anticuerpo Fd constituido por un dominio VH). Preferiblemente, un dominio de fijación de antígeno comprende una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH).

*Específico*

60 Este término puede utilizarse para hacer referencia a la situación en la cual un miembro de un par de fijación específica no exhibirá fijación significativa alguna a moléculas distintas de su o sus parejas de fijación específicas. El término es aplicable también en el caso en que v.g. un dominio de fijación de antígeno es específico para un epítipo particular que es transportado por varios antígenos, en cuyo caso el miembro de fijación específica que lleva el dominio de fijación de antígeno será capaz de fijarse a los diversos antígenos portadores del epítipo.

*Comprender*

Este término se utiliza generalmente en el sentido de incluir, es decir permitir la presencia de una o más características o componentes.

## Aislado

Este término hace referencia al estado en el cual miembros de fijación específica de la invención, o ácido nucleico codificante de dichos miembros de fijación, se emplearán generalmente de acuerdo con la presente invención. Los miembros y el ácido nucleico estarán exentos o sustancialmente exentos de material con el cual están asociados naturalmente, tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los cuales se encuentran aquéllos en su entorno natural, o el entorno en el cual se preparan los mismos (v.g., cultivo de células) cuando dicha preparación se realiza por tecnología de DNA recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes y considerarse todavía aislados para propósitos prácticos - por ejemplo los miembros estarán mezclados normalmente con gelatina u otros vehículos si se utilizan para recubrir placas de microtitulación para uso en inmunoensayos, o estarán mezclados con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilizan en diagnóstico o terapia. Los miembros de fijación específica pueden estar glicosilados, sea naturalmente o por sistemas de células eucariotas heterólogas (v.g. células CHO o NS0 (ECACC 85110503)), o pueden no estar glicosilados (por ejemplo si se producen por expresión en una célula procariota).

Como se ha indicado, un dominio de anticuerpo de fijación de antígeno dirigido contra fibronectina ED-B debe emplearse en realizaciones de la presente invención, y un dominio preferido de este tipo comprende los dominios VH y VL del anticuerpo L19. Formas modificadas de uno u otro de estos dominios pueden emplearse en realizaciones adicionales, v.g. el dominio VH de L19 o VL de L19 en cual se han realizado 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos en un CDR, v.g. CDR3, y/o FR, reteniendo dichos miembros de fijación específica la capacidad para fijar fibronectina ED-B. Tales sustituciones de aminoácidos son generalmente "conservadoras", por ejemplo el empleo de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina en sustitución de otro, o el empleo de un residuo polar en sustitución de otro, tal como arginina en sustitución de lisina, ácido glutámico en sustitución de ácido aspártico, o glutamina en sustitución de asparagina. En ciertas posiciones son permisibles sustituciones no conservadoras.

La presente invención se extiende adicionalmente al empleo de un miembro de fijación específica que compite con el anticuerpo L19 para fijación a fibronectina ED-B. La competición entre miembros de fijación puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo por marcación de una molécula informadora específica para un miembro de fijación que puede ser detectado en presencia de otro u otros miembros de fijación no marcados, a fin de permitir la identificación de miembros de fijación específica que fijan el mismo epítoto solapante.

Además de secuencias de anticuerpos, un miembro de fijación específica empleado de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, v.g. formando un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado o impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para fijar un antígeno. Los miembros de fijación específica de la invención pueden llevar un marcador detectable.

Los miembros de fijación específica en un conjugado de acuerdo con la invención pueden utilizarse en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz del conjugado. Las condiciones tratables de acuerdo con la presente invención se exponen en otro lugar de esta memoria.

De acuerdo con ello, la invención se refiere a métodos de tratamiento que comprenden administración de un miembro de fijación específica tal como se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho miembro de fijación específica, y el uso de dicho miembro de fijación específica en la fabricación de un medicamento para administración, por ejemplo en un método de fabricación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de fijación específica con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones proporcionadas pueden ser administradas a individuos. La administración se realiza preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para demostrar beneficio para un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la tasa y evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad del mal que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, v.g. las decisiones en cuanto a dosificación, etc. está dentro de la responsabilidad de los médicos generalistas y otros doctores en medicina. Las dosis apropiadas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica; véase Ledermann J.A. *et al.* (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D. *et al.* (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, sea simultáneamente o en secuencia, dependiendo de la afección a tratar.

Los miembros de fijación específica de la presente invención, con inclusión de aquéllos que comprenden un dominio de anticuerpo de fijación de antígeno, pueden administrarse a un paciente en necesidad de tratamiento por cualquier ruta adecuada, usualmente por inyección en el torrente sanguíneo y/o directamente en el sitio a tratar, v.g. tumor. La dosis precisa dependerá de varios factores, la ruta de tratamiento, el tamaño y la localización del área a tratar (v.g. tumor), la naturaleza exacta del anticuerpo (v.g. anticuerpo entero, molécula scFv), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula fijada al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará comprendida en el intervalo de 10 a 50 mg. Esta es una dosis para un tratamiento simple de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para muchachos y niños pequeños, y ajustarse también para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso

molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, bisemanales, semanales o mensuales, a discreción del médico.

Los miembros de fijación específica de la presente invención se administrarán usualmente en la forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de fijación específica.

Así pues, las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, o por inyección, v.g. intravenosa.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo se encontrará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está exenta de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas. Las personas con experiencia relevante en la técnica están perfectamente capacitadas para preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer, o inyección de Ringer Lactada. En caso requerido, pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, sea simultánea o secuencialmente, dependiendo de la afección a tratar. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos aliviadores del dolor tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (v.g. aspirina, paracetamol, ibuprofeno o quetoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o anti-eméticos.

Aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica, dada la presente exposición. Los aspectos y realizaciones de la invención se ilustran en la sección experimental siguiente.

## Experimental

### Ejemplo 1

#### *Construcción y actividad anti-tumor in vivo de la fusión anticuerpo-IL2*

#### 35 *Materiales y métodos*

##### *Construcción y expresión de la proteína de fusión L19-IL2*

Se construyó el L19-IL2 cDNA por fusión de una secuencia sintética codificante de IL2 humana al extremo 3' de la secuencia codificante del scFv L19. La representación esquemática del constructo L19-IL2 cDNA se muestra en la Figura 1. Se amplificó IL2 cDNA por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores BC-666 y BC695 y, como molde, el IL2 cDNA producido por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) partiendo de RNA de linfocitos de sangre periférica humana activados por fitohemaglutinina (PHA) como ha sido descrito por Meazza *et al.* 1996 (18).

El iniciador directo BC666 (secuencia: ctcgaattctctctcatcgggtagta gctctccggctcatcgccagcggcgcacctacttcaagttc-taca) contenía la secuencia de la enzima de restricción EcoRI, un 45 pb codificante de un enlazador de 15 aminoácidos (Ser<sub>4</sub>-Gly)<sub>3</sub> y 21 bases de la secuencia de IL2 humana madura.

El iniciador inverso BC-695 (secuencia: ctcggatccttcaattcagatcct ctctgagatgagttttgttcagtcagtggtgagatgatgct) contenía la secuencia myc (13), dos codones de parada y la secuencia de la enzima de restricción BamHI.

El scFv L19, que contenía en su extremo 5' la secuencia genómica del péptido señal conductor de secreción como ha sido consignado por Li *et al.* 1997 (19), se amplificó por PCR utilizando el iniciador T7 en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y el iniciador BC-679 (secuencia: CTCGAATTCtttgattccaccttggtccc) que contenía 21 pb del extremo 3' de L19 y la secuencia de la enzima de restricción EcoRI. El gen fusionado se secuenció, se introdujo en el vector pcDNA3.1 que contenía el promotor de Citomegalovirus (CMV) y se expresó en células P3U1 en presencia de G418 (750 µg/ml, Calbiochem, San Diego, CA). Se escrutaron clones de las células resistentes a G418 en cuanto a la secreción de la proteína de fusión L19-IL2 por ELISA utilizando el dominio recombinante ED-B de la fibronectina (FN) humana como antígeno.

##### *Fragmentos recombinantes FN, inmunoensayo ELISA y purificación de la proteína de fusión L19-IL2*

Se produjeron fragmentos FN recombinantes que contenían las repeticiones de homología tipo III 7B89 y ED-B, como ha sido descrito por Carnemolla *et al.* 1996 (20). El inmunoensayo ELISA se realizó como ha sido consignado por Carnemolla *et al.* 1996 (20). La proteína de fusión L19-IL2 se purificó a partir del medio acondicionado de un clon positivo utilizando el fragmento de fibronectina humana recombinante 7B89 conjugado a Sepharose, por cromatografía de afinidad como ha sido consignado por Carnemolla *et al.* 1996 (20). El tamaño de la proteína de fusión se analizó

en condición reductora sobre SDS-PAGE y en condición natural por filtración con gel FPLC en una columna de cromatografía Superdex S-200 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

#### Bioensayo de IL2

La actividad de IL2 de la proteína de fusión L19-IL2 se determinó utilizando la línea de células de ratón CTLL, que se sabe prolifera en respuesta a IL2 humana como ha sido descrito por Meazza *et al.* 1996, (18). Se utilizaron diluciones seriadas de la proteína de fusión L19-IL2 y de una mezcla equimolar de L19 e IL2 humana recombinante (Proleukin, Chiron) a concentraciones de 1000 a 0,01 ng/ml en el ensayo de proliferación de CTLL-2.

#### Animales y líneas de células

Se obtuvieron ratones hembra atímicos lampiños (ratones de 8 semanas lampiño/lampiño CD1, hembras) de Harlan Italy (Correzzana, Milán, Italia). F9, un carcinoma de embrión de ratón, células T de ratón (CTLL-2) y células de mieloma de ratón se adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.); N592, la línea de células humanas de Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas (SCLC), fue proporcionada amablemente por el Dr. J.D. Minna (National Cancer Institute and Naval Hospital, Bethesda, Maryland); C51, una línea de células de adenocarcinoma de colon de ratón derivada de BALB/c, fue proporcionada amablemente por el Dr. M.P. Colombo (21).

#### Biodistribución de la proteína de fusión L19-IL2

L19-IL-2 purificada se sometió a radiomarcación con yodo-<sup>125</sup> utilizando el método Iodogen (22) (Pierce, Rockford, IL). La L19-IL-2 inmunorreactiva radiomarcada (más de 90%) se purificó por afinidad en una columna de cromatografía 7B89/Sepharose. Ratones lampiños con teratocarcinoma murino F9 implantado subcutáneamente (20, 23) se inyectaron por vía intravenosa con aproximadamente 10  $\mu$ g (4  $\mu$ Ci) de proteína en 100  $\mu$ l de solución salina. Se utilizaron tres animales para cada momento puntual. Se sacrificaron los ratones al cabo de 3, 6 y 24 horas después de la inyección. Se pesaron los órganos y se contó la radiactividad. Todos los órganos y tumores se pusieron en fijador para análisis histológico y microautorradiografía. Los resultados de direccionamiento de órganos representativos se expresan como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

#### Tratamiento *in vivo* con la proteína de fusión L19-IL2

El tratamiento con la proteína de fusión L19-IL2 purificada se realizó en grupos de 6 ratones, inyectado cada uno subcutáneamente con 20 x 10<sup>6</sup> células N592 o 10<sup>6</sup> células C51 o 3 x 10<sup>6</sup> células F9. Veinticuatro horas después de la inyección con las células N592, F9 y C51, se inyectaron 12  $\mu$ g de la proteína de fusión L19-IL2 en la vena del rabo de cada animal diariamente durante 10-15 días. Grupos similares de animales (6 por grupo) se inyectaron con una mezcla de L19 (8  $\mu$ g) e IL2 humana recombinante (4  $\mu$ g), correspondiente a 72.000 IU (Proleukin, 18 x 10<sup>6</sup> IU, Chiron) y con Tampón de Fosfato-Solución Salina de pH 7,4 (PBS) durante el mismo número de días. Al final del tratamiento, se sacrificaron los animales, se pesaron los tumores y los órganos (pulmones, hígados, corazones, riñones) y se pusieron los tumores en fijador para análisis histológico.

#### Análisis por microautorradiografía, inmunohistoquímica y análisis estadístico

Muestras de tumor y de órganos se procesaron para microautorradiografía a fin de evaluar el patrón de distribución de la proteína de fusión <sup>125</sup>I-L19-IL2 en los tumores u órganos como ha sido descrito por Tarli *et al.* 1999 (12). Los procedimientos inmunohistoquímicos se realizaron como ha sido consignado por Castellani *et al.* 1994 (11). Se utilizó el ensayo no paramétrico Mann-Whitney para evaluar las diferencias en los pesos de los tumores entre los 3 grupos diferentes de animales (ratones tratados con la proteína de fusión L19-IL2, con mezcla de L19+IL2 y PBS).

## Resultados

#### Constructo L19-IL2 y selección de los clones que expresan la proteína de fusión L19-IL2

Los clones resistentes a G418 se escrutaron respecto a la especificidad de anticuerpo de los sobrenadantes para la secuencia ED-B por ELISA como se ha descrito previamente. Los sobrenadantes de los clones que exhibían especificidad inmunológica para la secuencia ED-B se ensayaron respecto a actividad biológica de IL2.

La scFv L19 y la proteína de fusión L19-IL2 se corrieron en SDS-PAGE. L19-IL2 se purifica en un solo paso por cromatografía de afinidad; contaminaciones menores que 10% eran detectables por SDS-PAGE. La proteína de fusión exhibía un peso molecular aparente de aproximadamente 42 Kd, en línea con el tamaño esperado de la proteína de fusión. El análisis por FPLC de la proteína de fusión en una columna de cromatografía S200 Superdex (Pharmacia) demostró que la proteína, en condiciones nativas, está constituida por aproximadamente 70% de dímeros y 30% de monómeros como se ha observado previamente para la scFv L19. Tanto la actividad inmunológica del componente scFv L19 como la actividad biológica del componente IL-2 en la proteína purificada se ensayaron (Figura 3). Ambas actividades específicas eran comparables con las moléculas purificadas separadas.

## ES 2 269 361 T3

### *Biodistribución de la proteína de fusión radiomarcada L19-IL2 en ratones portadores de tumores*

Para investigar si la proteína de fusión L19-IL2 era capaz de localizarse eficientemente en los vasos tumorales, como ha sido consignado para la scFv L19 por Tarli *et al.* 1999 (12), se realizaron experimentos de biodistribución en ratones portadores del teratocarcinoma F9.

Se demostró inmunohistoquímicamente que la proteína de fusión L19-IL2 teñía fuertemente los vasos sanguíneos del tumor glioblastoma. Se inyectó la proteína de fusión L19-IL2 radioyodada en la vena del rabo de ratones con tumores F9 implantados subcutáneamente, y se obtuvo la distribución de la proteína de fusión L19-IL2 en momentos diferentes: 3, 6 y 24 horas. El catorce por ciento de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) se localizaba en el tumor 3 horas después de la inyección, como se consigna en la Tabla 1. La localización de la proteína de fusión L19-IL2 en la neovasculatura tumoral se confirmó por análisis microrradiográfico.

La acumulación de la proteína de fusión radiomarcada se demostró en los vasos sanguíneos del tumor de ratón F9. No se detectó acumulación alguna de proteína de fusión radiomarcada en los vasos del hígado o de otros órganos de los ratones portadores de tumor.

### *Tratamiento de los ratones portadores de tumor con la proteína de fusión L19-IL2*

La eficacia de la proteína de fusión L19-IL2 en la supresión del crecimiento de los tumores se ensayó en tres modelos de tumor experimental diferentes: teratocarcinoma de ratón, F9; adenocarcinoma de ratón, C51 y cáncer de pulmón humano de células pequeñas, N592. Para la inducción de los tumores, se inyectaron subcutáneamente células de cada tipo de tumor (específicamente  $20 \times 10^6$  para N592,  $10^6$  para C51 y  $3 \times 10^6$  para F9) en los animales. Veinticuatro horas después, los animales comenzaron a recibir una inyección intravenosa diaria de PBS (6 animales), una mezcla de L19 e IL2 (6 animales) o la proteína de fusión L19-IL2 (6 animales) durante 10-15 días. Veinticuatro horas después de la última inyección se sacrificaron los animales, se retiró la masa tumoral y se pesaron los tumores.

Los resultados, resumidos en la Tabla 2, muestran una disminución significativa en el crecimiento del tumor en el grupo de animales tratados con la proteína de fusión L19-IL2 con respecto tanto a los animales inyectados con una mezcla equimolar de las proteínas L19 e IL2 como al tercer grupo tratado con PBS.

Los tumores de teratocarcinoma F9 se disecaron a partir de ratones lampiños después de 11 días de tratamientos intravenosos. En el grupo de tratamiento con la proteína de fusión L19-IL2, la masa tumoral crecía solamente en 3 de 6 ratones. Se utilizó el ensayo no paramétrico de Mann-Whitney para determinar la significación estadística de las diferencias en los pesos de tumor entre los 3 grupos de animales. Las diferencias en los pesos de tumor entre el tratamiento con la proteína de fusión (L19-IL2), el tratamiento con PBS o con una mezcla (L19+IL2) eran estadísticamente significativas (véase la Tabla 3).

### **Referencias**

- 1) Folkman *Nat. Med.* 1: 27, 1995.
- 2) O'Reilly *et al. Nat. Med.* 2: 689, 1996.
- 3) O'Reilly *et al. Cell*, 88, 277, 1997.
- 4) Friedlander *et al. Science*, 270: 1500, 1995.
- 5) Pasqualini *et al. Nat. Biotechnol.* 15: 542, 1997.
- 6) Huang *et al. Science*, 275: 547, 1997.
- 7) Kim *et al. Nature*, 362: 841, 1993.
- 8) Schmidt-Erfurth *et al. Br. J. Cancer*, 75: 54, 1997.
- 9) Zardi *et al. EMBO J.*, 6, 2337-2342 (1987).
- 10) Carnemolla *et al. J. Cell Biol.*, 108, 1139-1148 (1989).
- 11) Castellani *et al. Int. J. Cancer*, 59, 612-618 (1994).
- 12) Tarli *et al. Blood*, 94: 192-198, 1999.
- 13) Viti *et al. Cancer Res.* 59: 347, 1999.
- 14) Taniguchi *et al. Cell* 73:5-8, 1993.

## ES 2 269 361 T3

- 15) **Rosenberg** *J. Clin. Oncol.* 10:180-199, 1992.
- 16) Siegel and Puri Interleukin-2 toxicity. *J. Clin. Oncol.* 9:694-704, 1991.
- 5 17) **Lode** *et al. Pharmacol. Ther.* 80:277-292, 1998.
- 18) **Meazza** *et al. Br. J. Cancer*, 74: 788-795, 1996.
- 19) **Li** *et al. Protein Engineering*, 10: 731, 1997.
- 10 20) **Carnemolla** *et al. Int. J. Cancer* 68:397, 1996.
- 21) **Colombo** *et al. Cancer Metastasis Rev.* 16:421-432, 1997.
- 15 22) **Salacinski** *et al. Anal. Biochem.* 117:136, 1981.
- 23) **Neri** *et al. Nat. Biotechnol.* 15:1271, 1997.

TABLA 1

*Biodistribución de la proteína de fusión L19-IL2 radiomarcada en Ratones Portadores de Tumores*

%ID/g Tiempo	Tumor	Sangre	Piel	Hígado	Bazo	Riñón	Vejiga	Tiroides	Corazón	Pulmón	Músculo	
3	14.01±2.12	6.97±1.14	2.73±0.59	2.61±0.41	3.90±0.97	4.69±0.53	2.16±1.42	5.13±0.60	2.27±0.45	10.32±1.83	1.34±0.75	
6	8.96±1.41	2.65±0.73	1.46±0.57	1.23±0.19	2.05±0.41	1.98±0.34	6.28±3.98	4.98±2.99	1.22±0.34	5.40±0.61	0.53±0.24	
30	24	4.06±1.06	0.14±0.04	0.56±0.43	0.13±0.05	0.16±0.05	0.19±0.08	0.83±0.51	0.22±0.12	0.09±0.04	0.48±0.27	0.05±0.02

Los estudios de biodistribución se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

Abreviatura: % DI/g, porcentaje de dosis inyectada de proteína de fusión L19-IL2 por grano de tejido.

TABLA 2

*Efecto de la proteína de fusión L19-IL2 sobre el crecimiento de los tumores*

Células tumorales	Proteína de fusión L19-IL2*	L19+IL2	PBS
C51	0,017 ± 0,02 <sup>1</sup>	0,228 ± 0,14	0,410 ± 0,17
N592	0,173 ± 0,17	0,705 ± 0,32	1,178 ± 0,75
F9	0,061 ± 0,10 <sup>2</sup>	0,665 ± 0,40	1,715 ± 0,57

Los valores consignados representan el peso medio del tumor (g) ± desviación estándar; se utilizaron grupos de seis ratones para cada experimento. 1: Una masa tumoral creció únicamente en 4 ratones de 6.

2: Una masa tumoral creció únicamente en 3 ratones de 6.

\*: Las diferencias en los pesos de tumor entre el tratamiento con la proteína de fusión (L19-IL2) y los grupos de control de PBS o mezcla (L19 + IL2) eran estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ )

# ES 2 269 361 T3

TABLA 3

*Comparación estadística (valores  $P$ ) entre los diferentes grupos de tratamiento en tres tipos de tumor*

Grupos comparados	Tipos de tumor		
	F9	N592	C51
Proteína de fusión L19-IL2/PBS	0,002	0,004	0,002
Proteína de fusión L19-IL2/mezcla (L19+IL2)	0,004	0,009	0,002
Mezcla (L19+IL2)/PBS	0,004	0,093	0,093

TABLA 4

## SECUENCIAS DE LOS INICIADORES

### 2) flagfoNotPicz2

5' -ACT CAG TAA GGC GGC CGC CTA TTA CTT ATC GTC ATC GTC CTT GTA GTC-3'

### 3) XbaIL19fo

5' -TCC GTC TAG ATC AGC GCT GCC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC TTG-3'

### 4) IfnXbaba

5' -GGC AGC GCT GAT CTA GAC GGA TGT TAC TGC CAC GGC ACA GTC ATT GAA AGC-3'

### 5) Ifnflagfol

5' -ATC GTC ATC GTC CTT GTA GTC GCA GCG ACT CCT TTT CCG CTT -3'

### 6) IFNBamba

5' AAA TCC GGA TCC GCG GGA TGT TAC TGC CAC GGC ACA GTC

### 7) IFNEcoba

5' GAT GGG GGA ATT CTT GGT TCA TCC GGA TGT TAC TGC CAC GGC ACA GTC ATT GAA 3'

### 8) IFNEcofo

5' GGA TGA ACC AAG AAT TCC CCC ATC GCC GCA GCG ACT CCT TTT CCG CTT 3'

### 9) SeqPicback

5' G CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TT 3'

### 10) SeqPicfor

5' G ATG ATG GTC GAC GGC GCT ATT CAG 3'

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un conjugado de (i) un miembro de fijación específica, que es específico para fibronectina ED-B y (ii) interleu-  
quina-2 (IL-2), para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
2. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método de tratamiento de un tumor.
- 10 3. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 **caracterizado** porque el miembro de  
fijación específica comprende uno o más dominios VH y/o VL del anticuerpo L19 y/o compite con el anticuerpo  
L19 para fijación a fibronectina ED-B, describiéndose las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL del  
anticuerpo L19 en Pini *et al.*, (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 21769-21776.
- 15 4. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el miembro de fijación  
específica es monocatenario.
5. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una proteína de fusión de (a) dicho miembro  
de fijación específica y (b) interleuquina-2.
- 20 6. Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el miembro de fijación  
específica es multicatenario.
7. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende (a) una proteína de fusión de una prime-  
ra cadena del miembro de fijación específica e interleuquina-2 y (b) una segunda cadena del miembro de fijación  
25 específica.
8. Uso de un conjugado de (i) un miembro de fijación específica, específico para fibronectina ED-B y (ii) interleu-  
quina-2 (IL-2) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.
- 30 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el miembro de fijación específica comprende uno  
o más dominios VH y/o VL del anticuerpo L19 y/o compite con el anticuerpo L19 para fijación a fibronectina ED-B,  
describiéndose las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL del anticuerpo L19 en Pini *et al.* (1998) *J.*  
*Biol. Chem.* 273: 21769-21776.
- 35 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9 en el cual el miembro de fijación específica es  
monocatenario.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende una proteína de fusión de (a) dicho miembro de  
fijación específica y (b) interleuquina-2.
- 40 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el cual el miembro de fijación específica es  
multicatenario.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende (a) una proteína de fusión de una primera cadena del  
45 miembro de fijación específica e interleuquina-2 y (b) una segunda cadena del miembro de fijación específica.

50

55

60

65

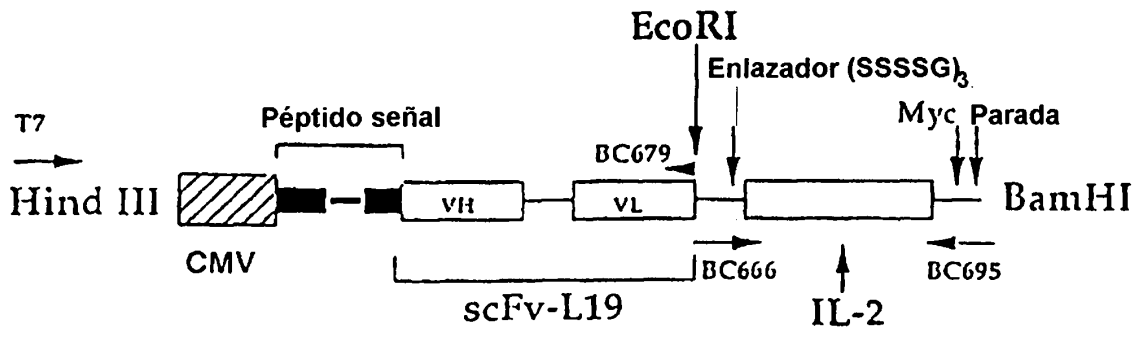


Figura 1

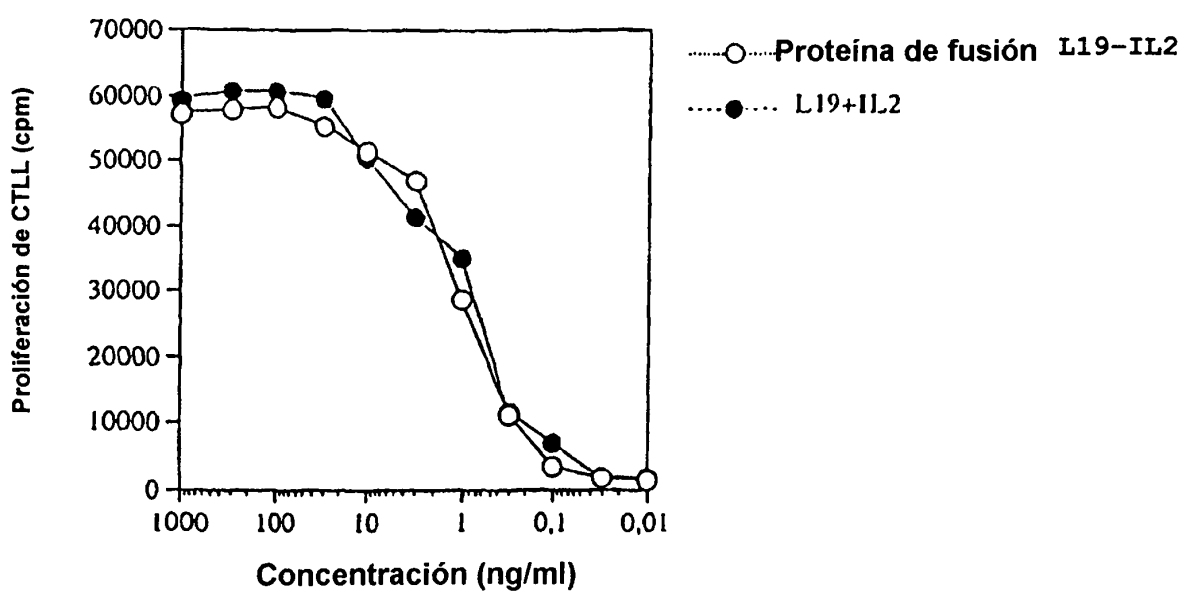


Figura 2

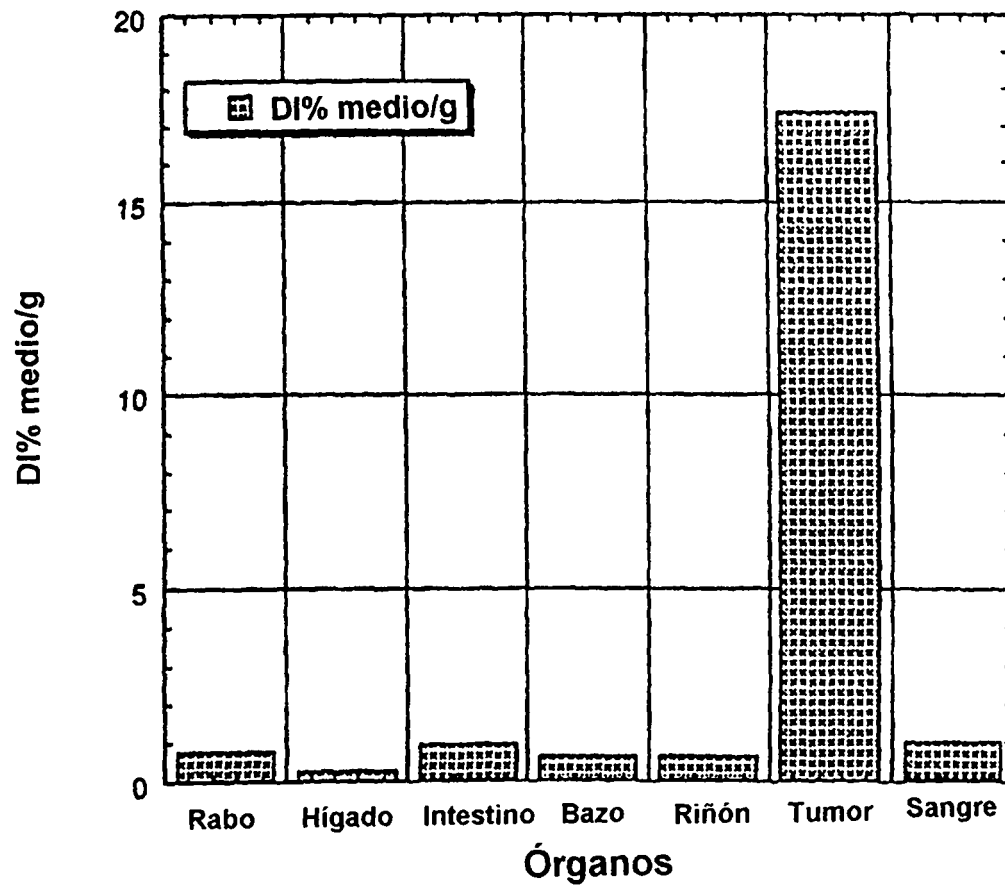


Figura 3