



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 743**

51 Int. Cl.:
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04764695 .5**
96 Fecha de presentación : **01.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1663320**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Reconocimiento de la vasculatura tumoral como diana mediante el anticuerpo L19 radiomarcado dirigido contra el dominio ED-B de fibronectina.**

30 Prioridad: **10.09.2003 EP 03255633**
10.09.2003 US 501881 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2011

73 Titular/es: **Philogen S.p.A.**
Piazza la Lizza, 7
53100 Siena, IT
Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft

72 Inventor/es: **Borsi, Laura;**
Carnemolla, B.;
Balza, Enrica;
Castellani, P.;
Zardi, L.;
Friebe, Matthias y
Hilger, Christoph-Stephan

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 361 743 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

Reconocimiento de la vasculatura tumoral como diana mediante el anticuerpo L19 radiomarcado dirigido contra el dominio ED-B de fibronectina

5

[0001] La presente invención se refiere al reconocimiento de la vasculatura tumoral como diana mediante moléculas de anticuerpos radiomarcadas de acuerdo con la reivindicación 1. En particular, la invención se refiere al uso de moléculas de anticuerpos que se unen al dominio ED-B de fibronectina y que son de utilidad demostrada en el reconocimiento de tumores como diana. En particular, las moléculas de anticuerpos son miniinmunoglobulinas, como las que se generan por la fusión de una molécula de anticuerpo scFv con el dominio constante CH4 de una isoforma secretora de IgE que contiene de manera natural una cisteína en su extremo COOH, la cual forma un dímero ligado covalentemente. La velocidad de aclaramiento sanguíneo, la estabilidad *in vivo* y otras propiedades ventajosas se emplean en diferentes aspectos y realizaciones de la invención, por ejemplo, en el reconocimiento de tumores como diana. El diferente comportamiento *in vivo* de diferentes formatos de las moléculas de anticuerpo puede explotarse para distintos fines de diagnóstico y/o terapéuticos, en función de las necesidades clínicas y de la enfermedad.

10

15

20

25

[0002] A pesar de su enorme potencial como agentes terapéuticos, los anticuerpos monoclonales (mAb) de origen no humano no han dado buenos resultados en ensayos clínicos debido a su inmunogenia (1 Shawlert y col., 1985; 2 Miller y col., 1983), sus deficientes propiedades farmacocinéticas (3 Hakimi y col., 1991; 4 Stephens y col., 1995) y la ineficiencia en la búsqueda de funciones efectoras (5 Riechmann y col., 1988; 6 Junghens y col., 1990). La perspectiva reciente de aislar fragmentos de anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de expresión en fagos (7 McCafferty y col., 1990; 8 Lowman y col., 1991; véanse los artículos de revisión 9 Nilsson y col., 2000 y 10 Winter y col., 1994) trasciende de estos problemas, a la vez que revitaliza estudios y revive las esperanzas de usar estos reactivos para el tratamiento de enfermedades de importancia. De hecho, estas moléculas deberían servir como elementos constructivos ideales para nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento (11 Reichert, 2001; Huls y col., 1999). Además, estos anticuerpos pueden "madurarse" para alcanzar afinidades en el intervalo picomolar (13 Pini y col., 1998), lo que al menos es deseable, si no necesario, para su uso clínico.

30

35

[0003] No obstante, las aplicaciones clínicas de fragmentos de anticuerpos humanos para la administración selectiva de agentes de diagnóstico o terapéuticos requieren dianas de gran especificidad. En el caso de los tumores, las dianas más populares son antígenos de la superficie celular, los cuales habitualmente no son abundantes ni estables. Sin embargo, durante la progresión del tumor, el microentorno que rodea a las células tumorales sufre una amplia modificación que genera un "entorno tumoral", el cual representa una diana para la terapia tumoral a base de anticuerpos (14 Neri y Zardi, 1998). De hecho, el concepto de que el microentorno tumoral alterado es un carcinógeno en sí mismo que puede utilizarse como diana es cada vez más aceptado. Por lo tanto, las moléculas capaces de suministrar eficazmente agentes terapéuticos al microentorno tumoral representan nuevas herramientas prometedoras e importantes para el tratamiento del cáncer (15 Bissel, 2001; 14 Neri y Zardi, 1998).

40

45

50

[0004] La fibronectina es un componente de la matriz extracelular (MEC) que se expresa ampliamente en diversos tejidos normales y fluidos corporales. Es posible generar isoformas diferentes de FN por un corte y empalme alternativo del pre-ARNm de FN, un proceso modulado por citocinas y el pH extracelular (16 Balza y col., 1988; 17 Carnemolla y col., 1989; 18 Borsi y col., 1990; 19 Borsi y col., 1995). La repetición completa de tipo III ED-B, también conocida como la repetición extra de tipo III B (EIIIB) puede estar presente o totalmente ausente en la molécula de FN (20 Zardi y col., 1987). La repetición ED-B está muy conservada en distintas especies, con una homología del 100% en todos los mamíferos estudiados hasta ahora (humanos, ratas, ratones, perros) y una homología del 96% con un dominio similar en pollos. La isoforma de FN que contiene ED-B (B-FN) no puede detectarse por medios inmunohistoquímicos en los tejidos adultos normales, con la excepción de los tejidos que sufren una reorganización fisiológica (por ejemplo, el endometrio y el ovario) y durante la cicatrización de las heridas (17 Carnemolla y col., 1989; 21 French-Constant y col., 1989). Por el contrario, su expresión es alta en tumores y tejidos fetales (17 Carnemolla y col., 1989). Además, se ha demostrado que B-FN es un marcador de la angiogénesis (22 Castellani y col., 1994) y que las células endoteliales que invaden los tejidos tumorales migran a lo largo de fibras de MEC que contienen B-FN (23 Tarli y col., 1999).

55

[0005] El reconocimiento selectivo de la vasculatura tumoral como diana se ha descrito mediante el uso de un anticuerpo recombinante humano, scFv(L19) (13 Pini y col., 98), específico para la isoforma B-FN (24 Carnemolla y col., 1996; 23 Tarli y col., 99; 25 Viti y col., 99; 26 Neri y col., 97; 27 Demartis y col., 2001). El anticuerpo puede usarse tanto en el diagnóstico *in vivo* (inmunoescintigrafía) como en estrategias terapéuticas que implican la administración selectiva de radioisótopos terapéuticos o agentes tóxicos a la vasculatura tumoral. Además, Birchler y

col. (28 1999) demostraron que scFv(L19) acoplado químicamente a un fotosensibilizante se acumula selectivamente en los vasos sanguíneos de nueva formación en el modelo angiogénico de córnea de conejo y, después de la irradiación con luz del infrarrojo próximo, da lugar a una oclusión completa y selectiva de la neovasculatura ocular.

5

[0006] Más recientemente, Nilsson y col. (29 2001) describieron que el inmunoconjugado de scFv(L19) con el dominio extracelular del factor tisular da lugar a un infarto selectivo en distintos tipos de modelos tumorales murinos. Además, las proteínas de fusión de scFv(L19) e IL-2 o IL-12 han demostrado la mejora de la eficacia terapéutica de estas dos citocinas (30 Halin y col., enviado; 31 Carnemolla y col., 2002). Véase también el documento WO01/62298 para el uso de fusiones en el tratamiento de lesiones de angiogénesis patológica, incluyendo tumores. Finalmente, dado que L19 reacciona igualmente bien con ED-B de ratones y humanos, puede usarse tanto para estudios preclínicos como clínicos.

10

[0007] Véanse también los documentos PCT/GB97/01412, PCT/EP99/03210, PCT/EP01/02062 y PCT/IB01/00382.

15

[0008] Diferentes formatos de anticuerpos han mostrado un comportamiento diferente en cuanto a la estabilidad *in vivo*, aclaramiento y rendimiento en el reconocimiento de tumores como diana (32 Wu y col., 2000). Una miniinmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP) se describe en (33 Li y col., 1997).

20

[0009] La presente invención se basa en la preparación, caracterización e investigación de la biodistribución *in vivo* de moléculas del anticuerpo humano L19 en el formato de miniinmunoglobulina y marcadas con el radioisótopo ^{131}I .

25 *Breve descripción de las figuras***[0010]**

La figura 1 muestra modelos que ilustran las estructuras de distintas proteínas. A: modelo de la estructura de dominios de una subunidad de FN. Las secuencias de la proteína que sufren un corte y empalme alternativo se indican en color gris. Tal como se indica, el epítipo del anticuerpo recombinante L19 se localiza dentro de la repetición ED-B. B-D: esquemas de las construcciones usadas para expresar, respectivamente, L19(scFv) (comparación) (B), L19-SIP (C) y L19-IgG1/ κ (comparación).

30

La figura 2 muestra curvas de crecimiento de tumores SK-MEL-28 en ratones sin pelo (triángulos) y de tumores F9 en ratones de la cepa 129 (círculos). Se representa el volumen (mm^3) frente al tiempo (días). Cada punto de datos es la media de seis ratones \pm SD.

35

La figura 3 muestra los resultados de cromatografía de exclusión por tamaños para los diferentes formatos de L19. En los paneles A, B y C se muestran perfiles de cromatografía de exclusión por tamaños (Superdex 200) de los formatos scFv, miniinmunoglobulina e IgG1 de L19, respectivamente, después de la radioyodación. Los paneles D, E y F muestran perfiles de cromatografía de exclusión por tamaños (Superdex 200) de plasma en los tiempos indicados después de la inyección i.v. de los formatos de L19 radioyodados scFv, miniinmunoglobulina e IgG1, respectivamente. No se detectaron cambios en los perfiles de las curvas de L19-SIP o L19-IgG1 al cargar el plasma a tiempos diferentes después de la inyección, mientras que 3 h después de la inyección de L19(scFv)2 se observó un segundo pico de mayor peso molecular.

40

La figura 4 muestra los resultados de experimentos de biodistribución en ratones con tumores SK-MEL-28 para distintos formatos de la molécula de anticuerpo L19 radioyodados. Se muestran las variaciones del porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% ID/g) en el tumor (figura 4A) y en la sangre (figura 4B) a los tiempos indicados después de la inyección i.v. En la figura 4C se representan los cocientes tumor/sangre del % ID/g. Las curvas de L19(scFv) se indican por rombos, de L19 miniinmunoglobulina por cuadrados y de L19-IgG1 por triángulos.

45

La figura 5 muestra los experimentos de biodistribución en ratones con tumores F9 para L19(scFv) (cuadrados) y L19 miniinmunoglobulina (rombos) radioyodados. Se muestran las variaciones del % ID/g en el tumor (A) y en la sangre (B) a los distintos tiempos indicados después de la inyección i.v.

50

La figura 6 muestra el cambio en el área (mm^2) del tumor U251 con el tiempo (días) después de la inyección de disolución salina fisiológica y ^{131}I -L19-SIP, respectivamente.

55

[0011] La presente invención se refiere a miembros de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1, que se unen al dominio ED-B humano de fibronectina, en que los miembros de unión específica se marcan radiactivamente con el isótopo. La invención proporciona también procedimientos para producir tales miembros de unión específica y su uso en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

5 [0012] Los miembros de unión específica de la invención mostraron propiedades favorables en experimentos con animales, como mayores dosis administradas al tumor en comparación con la médula ósea y mayor acumulación en el tumor.

10 [0013] En un aspecto, la presente invención proporciona un miembro de unión específica que se une al dominio ED-B humano de fibronectina y que comprende el dominio VH de L19 y un dominio VL, opcionalmente el dominio VL de L19, en que el miembro de unión específica comprende una miniinmunoglobulina que comprende dichos dominios de anticuerpo VH y VL fusionados a ϵ_{S2} -CH4 y el miembro de unión dimerizado se marca radioactivamente con el isótopo.

15 [0014] Un marcador radioactivo o una molécula radiomarcada puede asociarse al miembro de unión específica, en que dicho miembro de unión específica puede marcarse, por ejemplo, en un resto de tirosina, lisina o cisteína.

20 [0015] Las secuencias de los dominios VH y VL de L19 se exponen en Pini y col. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776.

25 [0016] Por lo general, un dominio VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo. En una realización preferida, el dominio VH de L19 se empareja con el dominio VL de L19, de modo que se forma un sitio de unión al antígeno que comprende los dos dominios VH y VL de L19. La promiscuidad de las cadenas ligeras está bien establecida en la técnica.

30 [0017] Las regiones CDR pueden tomarse de los dominios VH o VL de L19 e incorporarse en una estructura adecuada. Esto se discute en más detalle a continuación. Las CDR 1, 2 y 3 de VH de L19 se muestran en SEQ ID NO. 1, 2 y 3, respectivamente. Las CDR 1, 2 y 3 de VL de L19 se muestran en SEQ ID NO. 4, 5 y 6, respectivamente.

35 [0018] En una realización preferida, el miembro de unión específica es L19-SIP marcado con ^{131}I (denominado en este documento ^{131}I -L19-SIP).

40 [0019] Es posible obtener variantes de los dominios VH y VL, cuyas secuencias se exponen en este documento y pueden emplearse en miembros de unión específica para ED-B por medio de procedimientos de alteración de secuencias o mutación y cribado.

45 [0020] Según se discute, de acuerdo con la presente invención pueden emplearse variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dos dominios VH y VL, cuyas secuencias se desvelan específicamente en este documento. Algunas variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido), probablemente 50 menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones pueden tener lugar en una o más regiones estructurales.

55 [0021] Un miembro de unión específica de acuerdo con la invención puede ser un miembro de acuerdo con la reivindicación 1 que compite por la unión a un antígeno con un miembro de unión específica que se une a ED-B y comprende un sitio de unión al antígeno formado por el dominio VH de L19 y el dominio VL de L19. La competencia entre miembros de unión específica puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo, mediante ELISA y/o mediante el marcaje con una molécula indicadora específica de un miembro de unión, el cual puede detectarse en presencia de otro(s) miembro(s) de unión sin marcar, para permitir la identificación de miembros de unión específica que se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapante.

[0022] Por lo tanto, otros aspectos de la presente invención emplean un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo humano que compite con L19 por la unión a ED-B.

[0023] Un miembro de unión específica de acuerdo con la presente invención puede unirse a ED-B con al menos la afinidad de L19, en que la afinidad de unión de distintos miembros de unión específica se compara en las condiciones apropiadas.

- [0024]** Además de las secuencias de anticuerpo, un miembro de unión específica de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que formen un péptido o polipéptido, como un dominio plegado o que impartan a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión específica de la invención pueden portar un marcador detectable o pueden conjugarse con una toxina o enzima (por ejemplo, por medio de un enlace peptídico o un enlazante).
- [0025]** En el tratamiento de trastornos o lesiones de angiogénesis patológica, un miembro de unión específica de la invención puede conjugarse con una molécula tóxica, por ejemplo, una molécula biocida o citotóxica que puede seleccionarse entre interleucina-2 (IL-2), doxorubicina, interleucina-12 (IL-12), interferón- γ (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el factor tisular (preferentemente un factor tisular truncado, por ejemplo, los restos 1-219). Véase, por ejemplo, el documento WO01/62298.
- [0026]** Los miembros de unión específica de acuerdo con la invención pueden usarse en un procedimiento para el tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un procedimiento para el tratamiento (que puede incluir el tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un miembro de unión específica de la invención. Preferentemente, un miembro de unión específica de acuerdo con la invención ha de administrarse al paciente por vía parenteral. Las enfermedades tratables de acuerdo con la presente invención incluyen tumores, en particular tumores sólidos, y otras lesiones de angiogénesis patológica, incluyendo artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad y angiomas.
- [0027]** Los miembros de unión específica de acuerdo con la invención se adecuan bien al radiomarcado con el isótopo ^{131}I y el uso subsiguiente en radiodiagnóstico y radioterapia.
- [0028]** Otro aspecto más proporciona un procedimiento para producir un miembro de unión específica de la invención que comprende el marcaje de un miembro de unión específica con el radioisótopo ^{131}I .
- [0029]** Para marcar el miembro de unión específica directamente, pueden usarse como diana las fracciones de tirosina de la molécula. En este procedimiento concreto, el haluro I^- se oxida con un oxidante apropiado, por ejemplo, iodogen® (tubos recubiertos), perlas de yodo, cloramina T (sal de sodio de *N*-cloro-*p*-toluenosulfonamida), en presencia del principio activo (API).
- [0030]** El marcaje indirecto con yodo puede realizarse por medio del marcaje previo de un portador de halógeno bifuncional, preferentemente derivado, por ejemplo, de derivados de ácido benzoico, derivados del reactivo de Bolton-Hunter, derivados de benceno. El portador puede transformarse en una especie activada para conjugarse con el grupo ϵ -amino de los restos de lisina del extremo N del API. Este procedimiento indirecto proporciona también una ruta sintética para marcar radioactivamente los compuestos peptídicos de manera quimioselectiva en el grupo sulfhidrido de una fracción de cisteína. Las moléculas unidas por puentes de cisteína pueden ser reducidas primeramente por un agente reductor adecuado, por ejemplo: cloruro de estaño(II), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), lo que genera grupos SH de cisteína libres que pueden reaccionar con el portador de halógeno. Como grupos funcionales para la unión pueden emplearse derivados de maleimida y α -bromoacetamida.
- [0031]** Un procedimiento para la producción de un miembro de unión específica de acuerdo con la invención puede comprender la expresión del ácido nucleico que codifica el miembro de unión específica antes de marcar dicho miembro de unión específica. Por lo tanto, como paso previo, el procedimiento para la producción del miembro de unión específica puede comprender opcionalmente causar o permitir la expresión del ácido nucleico codificante, es decir, el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el miembro de unión específica. Un procedimiento tal puede comprender el cultivo de células hospedadoras en condiciones para la producción de dicho miembro de unión específica.
- [0032]** Un procedimiento de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. El miembro de unión específica puede aislarse y/o purificarse después de la expresión del ácido nucleico y/o la recuperación a partir de las células hospedadoras. El aislamiento y/o purificación puede tener lugar antes del marcaje. Alternativa o adicionalmente, el miembro de unión específica puede aislarse y/o purificarse después del marcaje.
- [0033]** Un procedimiento de producción puede comprender la formulación del producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, como un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, el miembro de unión específica (marcado) puede formularse en una composición que incluye al menos un componente

adicional como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0034] Este y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

5 Terminología

Miembro de unión específica

- [0035]** Este término describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí.
- 10 Los miembros de un par de unión específica pueden ser de origen natural o producidos de manera total o parcialmente sintética. Un miembro del par de moléculas tiene una zona en su superficie o una cavidad que se une específicamente y que, por lo tanto, es complementaria de una organización espacial y polar concreta del otro miembro del par de moléculas. Por lo tanto, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Algunos ejemplos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor
- 15 hormonal, receptor-ligando, enzima-sustrato. Esta solicitud se refiere a las reacciones del tipo antígeno-anticuerpo.

Molécula de anticuerpo

- [0036]** Este término describe una inmunoglobulina, ya sea natural o producida de manera parcial o totalmente sintética. El término abarca también cualquier polipéptido o proteína que comprenda un dominio de unión de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión a un antígeno son tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos. La presente invención se refiere a miniinmunoglobulinas que comprenden ϵ_{S2} -CH4, según se desvela. Los experimentos descritos en este documento con las moléculas scFv e IgG1 son comparativos.
- 25 **[0037]** Es posible usar las técnicas de la tecnología del ADN recombinante para producir, a partir de una molécula de anticuerpo inicial, otras moléculas de anticuerpo que mantengan la especificidad de la molécula de anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar la introducción del ADN codificante de la región variable de la inmunoglobulina o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo dirigido contra las regiones constantes o las regiones constantes más las regiones estructurales de una inmunoglobulina diferente.
- 30 Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400.

- [0038]** Dado que los anticuerpos pueden modificarse de muchas maneras, el término "molécula de anticuerpo" deberá interpretarse como que abarca cualquier miembro o sustancia de unión específica con un dominio de anticuerpo que se une a un antígeno con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término abarca fragmentos y
- 35 derivados de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de inmunoglobulina de unión a un antígeno, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por consiguiente, también se incluyen moléculas quiméricas que comprendan un dominio de unión de inmunoglobulina o equivalente fusionado con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

40 *Dominio de unión a un antígeno*

- [0039]** Este término describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende la zona que se une específicamente y es complementaria de la totalidad o parte de un antígeno. En caso de que el antígeno sea de gran tamaño, puede que el anticuerpo se una solamente a una parte concreta del antígeno, en que esta parte se
- 45 denomina epítipo. Un dominio de unión a un antígeno puede constar de uno o más dominios de anticuerpo variables (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo denominado Fd que consta de un dominio VH). Preferentemente, un dominio de unión a un antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (VH).

50 *Específica*

- [0040]** Este término puede usarse para referirse a la situación en que un miembro de un par de unión específica no muestra ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica. El término puede aplicarse también cuando, por ejemplo, un dominio de unión a un antígeno es específico para un
- 55 epítipo concreto presente en una serie de antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que porta el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a varios antígenos que portan el epítipo.

Comprende

[0041] Este término se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir, de permitir la presencia de una o más características o componentes.

Aislado

5

[0042] Este término se refiere al estado en que estarán, por lo general, los miembros de unión específica de la invención o los ácidos nucleicos que codifican estos miembros de unión, de acuerdo con la presente invención. Los miembros y ácidos nucleicos no contendrán o no contendrán sustancialmente material con el que están asociados de manera natural, como otros polipéptidos o ácidos nucleicos junto con los que se encuentran en su medio natural o en el medio en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular), cuando tal preparación se lleva a cabo por tecnología de ADN recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y ácidos nucleicos pueden formularse con diluyentes o coadyuvantes y aún así estar aislados para fines prácticos. Por ejemplo, los miembros se mezclarán normalmente con gelatina u otros vehículos si van a usarse para recubrir placas de microvaloración para inmunoensayos o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables si van a usarse para diagnóstico o tratamiento. Los miembros de unión específica pueden estar glicosilados, bien de manera natural o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503) o pueden estar sin glicosilar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procarionta).

[0043] Con “sustancialmente según se expone” se indica que el dominio pertinente VH o VL de la invención será idéntico o muy similar a las regiones especificadas cuya secuencia se expone en este documento. Con “muy similar” se contempla que pueden llevarse a cabo de 1 a 5, preferentemente de 1 a 4, como 1 a 3 ó 1 ó 2 ó 3 ó 4 sustituciones en los dominios VH o VL.

[0044] En general, la estructura para contener una CDR de la invención será la de una secuencia de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una parte sustancial de esta en la que la CDR está situada en una posición que corresponde a la de la CDR de los dominios variables del anticuerpo VH y VL de origen natural, codificados por genes de inmunoglobulina reorganizados. Las estructuras y posiciones de los dominios variables de la inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a la publicación Kabat, E. A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5.^a edición. US Department of Health and Human Services, 1991, y actualizaciones de la misma, disponibles ahora en internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> o buscar “Kabat” mediante cualquier buscador de internet).

[0045] Preferentemente, una secuencia de aminoácidos de una CDR sustancialmente según se expone en este documento está presente como CDR en un dominio variable humano o una parte sustancial de este. Las secuencias CDR3 de VH de L19 y/o CDR3 de VL de 19 sustancialmente según se exponen en este documento pueden usarse en realizaciones preferidas de la presente invención y se prefiere que cada una de estas secuencias esté presente como CDR3 en un dominio variable humano de cadena pesada o ligera, según sea el caso, o una parte sustancial de este.

[0046] Una parte sustancial de un dominio variable de una inmunoglobulina comprenderá al menos tres regiones CDR, junto con sus regiones estructurales intermedias. Preferentemente, esta parte incluirá también al menos aproximadamente el 50% de una o las dos regiones estructurales primera y cuarta, en que el 50% es el 50% C-terminal de la primera región estructural y el 50% N-terminal de la cuarta región estructural. Otros restos adicionales en los extremos N-terminal y C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos que no están asociados normalmente con regiones de dominios variables de origen natural. Por ejemplo, la construcción de los miembros de unión específica de la presente invención realizada por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de restos N o C-terminales codificados por enlazantes introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazantes para unir dominios variables de la invención a otras secuencias de proteínas, incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulinas, otros dominios variables o marcadores de proteínas según se discute con más detalle a continuación.

[0047] En una molécula de anticuerpo IgG1, es posible unir dominios VL por el extremo C-terminal a dominios constantes de cadenas ligeras de anticuerpos, incluyendo cadenas C κ o C λ humanas, preferentemente cadenas C κ .

55

[0048] Además del marcaje con ¹³¹I, los miembros de unión específica de la invención pueden marcarse con un segundo marcador detectable o funcional. Los marcadores detectables se describen a continuación e incluyen marcadores radioactivos como radioisótopos de tecnecio, indio, itrio, cobre, lutecio o renio, en particular ^{94m}Tc, ^{99m}Tc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹¹¹In, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y, ¹⁷⁷Lu, ⁶⁴Cu y ⁶⁷Cu, que pueden unirse a los anticuerpos de la invención mediante

procedimientos químicos convencionales conocidos en la técnica de obtención de imágenes con anticuerpos, según se describe en este documento. Otros radioisótopos que pueden usarse incluyen ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{43}Sc , ^{47}Sc , $^{110\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{68}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{121}Sn , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{105}Rh , ^{177}Lu , ^{172}Lu y ^{18}F .

5 **[0049]** Los marcadores incluyen también marcadores enzimáticos como la peroxidasa de rábano picante. Los marcadores pueden incluir además fracciones químicas como biotina, que pueden detectarse por medio de la unión a una fracción afín específica detectable, por ejemplo, avidina marcada.

[0050] Un ejemplo de un protocolo de marcaje es el siguiente:

10 Para marcar radioactivamente de manera directa los miembros de unión específica, las moléculas unidas por puentes de cisteína se reducen primeramente mediante un agente reductor apropiado, por ejemplo, cloruro de estaño(II), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), lo que genera grupos SH de cisteína libres que pueden reaccionar con los isótopos, por ejemplo de Tc o Re. En este procedimiento concreto, los permetalatos obtenidos de un sistema generador instantáneo se reducen por un agente reductor, por ejemplo cloruro de estaño(II) en presencia de un ligando auxiliar, por ejemplo, tartrato de sodio y el API (los detalles se proporcionan a continuación en la sección experimental).

[0051] El marcaje indirecto, por ejemplo, con indio, itrio, lantánidos o tecnecio y renio puede realizarse por preconjugación de un ligando quelante, preferentemente derivado del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido ciclohexil-1,2-diaminotetraacético (CDTA), ácido etilenglicol-*O,O*-bis(2-aminoetil-*N,N,N',N'*-diacético (HBED), ácido trietilentetraaminohexaacético (TTHA), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N,N',N'',N'''*-tetraacético (DOTA), 1,4,7-triazaciclononano-*N,N'',N''''*-triacético (NOTA), 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-*N,N',N'',N'''*-tetraacético (TETA), mercaptoacetildiglicina (MAG_2), mercaptoacetiltriglicina (MAG_3), mercaptoacetilglicilcisteína (MAGC), cisteinglicilcisteína (CGC), con grupos amina o tiol del miembro de unión específica. Los agentes quelantes tienen un grupo de acoplamiento adecuado, por ejemplo, ésteres activos, maleimidados, tiocarbamatos o fracciones acetamida α -halogenadas. Para la conjugación de ligandos quelantes con grupos amina, por ejemplo grupos $\epsilon\text{-NH}_2$ de restos de lisina, no se requiere la reducción previa del compuesto L19-SIP.

30 **[0052]** Los procedimientos para el marcaje de un miembro de unión específica pueden comprender la conjugación de un portador de halógeno bifuncional activado que contiene el radioisótopo ^{131}I con un resto de lisina o el extremo N y con un resto de cisteína del miembro de unión específica. El procedimiento puede comprender la conjugación del portador de halógeno con un resto de lisina o de cisteína del miembro de unión específica o con el extremo N del miembro de unión específica. Uno o los dos de (i) un resto de cisteína y (ii) un resto de lisina o el extremo N pueden marcarse con el mismo radioisótopo o con uno diferente de acuerdo con la invención.

40 **[0053]** Los miembros de unión específica de la presente invención están diseñados para usarse en procedimientos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, preferentemente humanos. Los miembros de unión específica son especialmente adecuados para su uso en procedimientos de radioterapia y radiodiagnóstico.

45 **[0054]** Por consiguiente, otros aspectos de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un miembro de unión específica semejante y el uso de un miembro de unión específica semejante en la preparación de un medicamento para administración, por ejemplo, en un procedimiento para la preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende la formulación del miembro de unión específica con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 **[0055]** Las indicaciones clínicas en las que puede usarse un miembro de unión específica de la invención para proporcionar un beneficio terapéutico incluyen tumores, como cualquier tumor sólido, también otras lesiones de angiogénesis patológica, incluyendo artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad y angiomas.

55 **[0056]** Los miembros de unión específica de acuerdo con la invención pueden usarse en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal, tal como un procedimiento para el tratamiento (que puede incluir el tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un miembro de unión específica de la invención. Preferentemente el tratamiento es radioterapia. Las enfermedades que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención se discuten en otra sección de este documento.

[0057] Los miembros de unión específica de acuerdo con la invención pueden usarse para la obtención de imágenes SPECT y para el tratamiento.

5 **[0058]** Debido al uso de distintos isótopos de un elemento para la obtención de imágenes y el tratamiento, la biodistribución de los inmunoconjugados respectivos es idéntica. Esto es una ventaja en comparación con otras estrategias que usan derivados marcados con ^{111}In para la obtención de imágenes con el fin de predecir la biodistribución de los derivados terapéuticos respectivos marcados con ^{90}Y , porque la biodistribución de los correspondientes derivados marcados con ^{111}In e ^{90}Y podría ser diferente; véase Carrasquillo, J. A. y col. (1999) J. Nucl. Med. 40: 268-276.

10

[0059] De acuerdo con la presente invención, las composiciones provistas pueden administrarse a individuos. La administración se realiza preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio para un paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y evolución temporal de la administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se trata. La prescripción del tratamiento, es decir, las decisiones en cuanto a la dosis, etc., es responsabilidad de los médicos generales y de otros médicos especialistas. Las dosis apropiadas del anticuerpo son bien conocidas en la técnica; véase Ledermann, J. A. y col. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe, K. D. y col. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922.

15 **[0060]** Una composición puede administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos, bien simultáneamente o secuencialmente, en función de la enfermedad que haya de tratarse.

[0061] Los miembros de unión específica de la presente invención, incluyendo aquellos que comprenden un dominio de unión a un antígeno de un anticuerpo, pueden administrarse a un paciente con necesidad de tratamiento por cualquier vía adecuada, normalmente por inyección en la corriente sanguínea y/o directamente en el lugar que ha de tratarse, por ejemplo, un tumor. Preferentemente, el miembro de unión específica ha de administrarse por vía parenteral. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, la vía de tratamiento, el tamaño y la localización de la zona que ha de tratarse (por ejemplo, un tumor), la naturaleza exacta del anticuerpo (por ejemplo, una molécula de anticuerpo IgG1 completa, una molécula de miniinmunoglobulina) y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula asociada a la molécula de anticuerpo. Una dosis típica del anticuerpo estará en el intervalo de 10-50 mg.

25 **[0062]** Esta es una dosis para un único tratamiento en un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y bebés y ajustarse también para otros formatos de anticuerpos en proporción con el peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, de dos veces en semana, semanales o mensuales, a discreción del médico.

[0063] Los miembros de unión específica de la presente invención se administrarán normalmente en forma de una composición farmacéutica que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específica.

40

[0064] Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención y para uso de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón o estabilizante farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deberán interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o por inyección, por ejemplo, intravenosa.

45

[0065] Para una inyección intravenosa o una inyección en el lugar afectado, el principio activo estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable, apirógena y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son perfectamente capaces de preparar disoluciones adecuadas, por ejemplo, con vehículos isotónicos como una inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

50

55 **[0066]** Una composición puede administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos, bien simultáneamente o secuencialmente, en función de la enfermedad que haya de tratarse. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos para alivio del dolor, como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos como morfina o antieméticos.

- [0067]** La presente invención proporciona un procedimiento que comprende causar o permitir la unión de un miembro de unión específica según se proporciona en este documento a ED-B. Según se señala, una unión tal puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo, después de la administración de un miembro de unión específica o de un ácido nucleico codificante de un miembro de unión específica, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ensayos de ELISA, inmunotransferencia, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad.
- [0068]** Es posible determinar la cantidad de unión del miembro de unión específica a ED-B. La cuantificación puede relacionarse con la cantidad del antígeno en una muestra de prueba, que puede tener interés diagnóstico.
- [0069]** Las reactividades de los anticuerpos en una muestra pueden determinarse de cualquier modo apropiado. Una posibilidad es el radioinmunoensayo (RIA). El antígeno radiomarcado se mezcla con antígeno sin marcar (muestra de prueba) y se permite que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno sin unir y se determina la cantidad de antígeno radioactivo unido al anticuerpo. Cuanto más antígeno haya presente en la muestra de prueba, menos antígeno radioactivo se unirá al anticuerpo. También puede usarse un ensayo de unión competitiva con un antígeno no radioactivo, mediante un antígeno o un análogo ligado a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o un colorante láser con características de emisión o absorción espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y rojo Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.
- [0070]** Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado como perlas de látex, que son de colores, magnéticas o paramagnéticas y agentes biológica o químicamente activos que pueden causar directa o indirectamente señales detectables para ser observadas visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalicen reacciones de desarrollo o cambio de color o que causen cambios de propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser excitables a nivel molecular, de modo que las transiciones electrónicas entre estados de energía resulten en absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas en combinación con biosensores. Pueden emplearse sistemas de detección con biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.
- [0071]** Las señales generadas por conjugados individuales anticuerpo-indicador pueden usarse para obtener datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del anticuerpo pertinente en las muestras (normal y de prueba).
- [0072]** La presente invención se extiende además a un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1 que compite por la unión a ED-B con cualquier miembro de unión específica que se una al antígeno y comprenda un dominio V que incluya una CDR con los aminoácidos sustancialmente según se exponen en este documento, preferentemente un dominio VH que comprenda la CDR3 de VH de SEQ ID NO. 3. La competencia entre los miembros de unión específica puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo, mediante el marcaje con una molécula indicadora específica de un miembro de unión que puede detectarse en presencia de otro(s) miembro(s) de unión sin marcar para permitir la identificación de miembros de unión específica que se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapante. La competencia puede determinarse, por ejemplo, mediante ELISA, según se describe en Carnemolla y col. (24 1996).
- [0073]** Según se afirma anteriormente, los procedimientos para la producción de miembros de unión específica de acuerdo con la invención pueden comprender la expresión del ácido nucleico codificante y, opcionalmente, pueden implicar el cultivo de células hospedadoras en las condiciones para la producción del miembro de unión específica. Los miembros de unión específica y moléculas de ácido nucleico codificantes y vectores según o para usar en la presente invención pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo a partir de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso del ácido nucleico, sin o sustancialmente sin ácidos nucleicos o genes de un origen distinto de la secuencia codificante de un polipéptido con la función requerida.
- [0074]** El ácido nucleico usado de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia nucleotídica según se expone en este documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada, en la que U sustituye a T, a menos que el contexto lo requiera de otro modo.
- [0075]** Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en diversas células hospedadoras diferentes son bien conocidos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células renales de hámster

recién nacido, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un hospedador bacteriano común preferido es *E. coli*.

- [0076]** La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Véase como revisión, por ejemplo, Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como opción para la producción de un miembro de unión específica, véanse como revisiones recientes, por ejemplo, Ref, M. E. (1993) *Curr. Opinión Biotech.* 4: 573-576; Trill, J. J. y col. (1995) *Curr. Opinión Biotech.* 6:553-560.
- 10 **[0077]** Pueden elegirse o construirse vectores adecuados con las secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virus, por ejemplo, fagos o fagémidos, según sea apropiado. Para más detalles véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3.ª edición*, Sambrook y col., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y el análisis de proteínas se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, segunda edición, Ausubel y col., John Wiley & Sons, 1992.
- 15 **[0078]** Un procedimiento para la producción de un miembro de unión específica de acuerdo con la invención puede comprender además la introducción del ácido nucleico codificante en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Las técnicas adecuadas para células eucariotas pueden incluir la transfección mediante fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, la transfección mediada por liposomas y la transducción por medio de retrovirus u otros virus, por ejemplo vaccinia o baculovirus para células de insectos. Las técnicas adecuadas para células bacterianas pueden incluir la transformación mediante cloruro de calcio, electroporación y la transfección por medio de bacteriófagos.
- 20 **[0079]** Después de la introducción puede causarse o permitirse la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células hospedadoras en las condiciones para la expresión del gen.
- 25 **[0080]** En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede potenciarse por la inclusión de secuencias que potencian la recombinación con el genoma de acuerdo con técnicas estándar.
- 30 **[0081]** Otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica, a la vista de la presente descripción, incluyendo los ejemplos experimentales siguientes. Los procedimientos para la síntesis y marcaje de los miembros de unión específica de la presente invención se ilustran con más detalle en los ejemplos siguientes.
- 35 **[0082]** Otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica, a la vista de la presente descripción, incluyendo los ejemplos experimentales siguientes. Los procedimientos para la síntesis y marcaje de los miembros de unión específica de la presente invención se ilustran con más detalle en los ejemplos siguientes.

40 Ejemplos experimentales de aspectos y realizaciones de la presente invención

1. Preparación y caracterización de miembros de unión específica de acuerdo con la presente invención

- [0082]** Los ejemplos siguientes usan compuestos peptídicos L19-SIP radiomarcados.

45 1.1 Síntesis de ¹³¹I-L19-SIP (procedimiento con cloramina T)

- [0083]** En un vial de reacción se pusieron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4), se mezclaron con 185 MBq de [¹³¹I]NaI y se hicieron reaccionar con 30 µl de una disolución nuevamente preparada de cloramina T (2 mg/ml) en PBS 0,2 M (pH 7,4). Después de 1 min, se añadieron 50 µl de una disolución de Na₂S₂O₅ (10 mg/ml en PBS 0,2 M, pH 7,4). El compuesto L19-SIP marcado con ¹³¹I se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino al 0,5% en PBS.

- 55 Rendimiento radioquímico: 45,7%.
 Pureza radioquímica: 88,3% (SDS-PAGE).
 Actividad específica: 31,7 MBq/nmol.
 Inmunorreactividad: 76%.

1.2 Síntesis de ¹³¹I-L19-SIP (procedimiento con iodogen)

- 5 **[0084]** Se mezclaron 800 µg de L19-SIP en 800 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 500 MBq de [¹³¹I]NaI y se pusieron en un vial de reacción (tubo recubierto con iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó con suavidad durante un periodo de 30 min a temperatura ambiente. El compuesto L19-SIP marcado con ¹³¹I se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino al 0,5% en PBS.
- | | | |
|----|---------------------------|-------------------|
| | Rendimiento radioquímico: | 93,2%. |
| | Pureza radioquímica: | 91,1% (SDS-PAGE). |
| | Actividad específica: | 46,6 MBq/nmol. |
| 10 | Inmunorreactividad: | 78%. |

1.3 Síntesis de ¹²³I-L19-SIP (procedimiento con iodogen) (comparación)

- 15 **[0085]** Se mezclaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 200 MBq de [¹²³I]NaI y se pusieron en un vial de reacción (tubo recubierto con iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó con suavidad durante un periodo de 30 min a temperatura ambiente. El compuesto L19-SIP marcado con ¹²³I se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino al 0,5% en PBS.
- | | | |
|----|---------------------------|-------------------|
| | Rendimiento radioquímico: | 81,6%. |
| | Pureza radioquímica: | 89,6% (SDS-PAGE). |
| | Actividad específica: | 61,2 MBq/nmol. |
| 20 | Inmunorreactividad: | 84%. |

1.4 Síntesis de ¹²⁴I-L19-SIP (procedimiento con iodogen) (comparación)

- 25 **[0086]** Se mezclaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 50 MBq de [¹²³I]NaI y se pusieron en un vial de reacción (tubo recubierto con iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó con suavidad durante un periodo de 30 min a temperatura ambiente. El compuesto L19-SIP marcado con ¹²¹I se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino al 0,5% en PBS.
- | | | |
|----|---------------------------|-------------------|
| | Rendimiento radioquímico: | 84,5%. |
| | Pureza radioquímica: | 89,6% (SDS-PAGE). |
| | Actividad específica: | 22,8 MBq/nmol. |
| 30 | Inmunorreactividad: | 86%. |

1.5 Síntesis de (propionato de 3-(4-hidroxi-3-[¹³¹I]yodofenilo)-L19-SIP

- 40 **[0087]** Se disolvieron 500 µg de (propionato de 3-(4-hidroxifenil)-N-(sulfonatosuccinimidilo) en 1 ml de DMSO. Se mezclaron 10 µl de cloramina T (5 mg/ml en PBS) con 74 MBq de [¹³¹I]NaI, neutralizado con 15 µl de PBS (0,2 M, pH 7,4). Se añadió 1 µl de la disolución de (propionato de 3-(4-hidroxifenil)-N-(sulfonatosuccinimidilo) a la disolución de cloramina T/[¹³¹I]NaI y la mezcla se dejó reaccionar durante 1 min. La reacción se detuvo por la adición de 40 µl de una disolución de Na₂S₂O₅ (10 mg/ml en PBS 0,2 M, pH 7,4), seguida de la adición inmediata de 200 µg de L19-SIP en 230 µl de tampón de borato (PBS 0,2 M, pH 8,5).
- 45 **[0088]** El compuesto (propionato de 3-(4-hidroxi-3-[¹³¹I]yodofenilo)-L19-SIP se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino al 0,5% en PBS.
- | | | |
|----|---------------------------|-------------------|
| | Rendimiento radioquímico: | 37,2%. |
| | Pureza radioquímica: | 94,6% (SDS-PAGE). |
| | Actividad específica: | 10,3 MBq/nmol. |
| 50 | Inmunorreactividad: | 69%. |

1.6 Cálculos MIRD para ¹³¹I-L19-SIP

- 55 **[0089]** A partir de los datos de biodistribución en ratones con tumores pudieron calcularse las dosis absorbidas de L19-SIP marcado con ¹³¹I mediante la metodología MIRD. El modelado biocinético se realizó con los datos de % ID de ¹³¹I-L19-SIP en ratones con glioblastoma humano (U251). Los tiempos de residencia se calcularon como las áreas bajo la curva de funciones bi y monoexponenciales integradas de cero a infinito, incluyendo la semivida biológica y física del compuesto.

[0090] Considerando los órganos del ratón a la vez como la fuente de radiación y como la diana de la radiación, las dosis absorbidas por los órganos como dosis autoaplicadas (sin fuego cruzado de radiación) pudieron estimarse para ¹³¹I-L19-SIP mediante los valores S del programa informático MIRDOSE 3.1.

5

[0091] Dosis en órganos de ratón (mGy/ MBq):

	hígado	50
	riñones	160
	bazo	50
10	pulmón	220
	ovarios	180-410 (dependiendo del estado del ciclo de ovulación y la expresión de ED-B)
	útero	600 (dependiendo del estado del ciclo de ovulación y la expresión de ED-B)
	testículos	55
	sangre	130
15	médula ósea	50 (cálculo basado en la dosis de la sangre)
	tumor	940 (calculada para un tumor de 100 mg)

[0092] Mediante el uso de los tiempos de residencia calculados en el programa MIRDOSE 3.1 pueden estimarse las dosis de ¹³¹I-L19-SIP absorbidas en humanos.

20

[0093] Dosis en órganos humanos (mGy/ MBq):

	glándulas suprarrenales	$9,46 \times 10^{-2}$
	cerebro	$1,64 \times 10^{-2}$
	mamas	$7,33 \times 10^{-2}$
25	vesícula biliar	$1,00 \times 10^{-1}$
	pared del intestino grueso inferior	$4,47 \times 10^{-1}$
	intestino delgado	$1,10 \times 10^{-1}$
	estómago	$9,45 \times 10^{-2}$
	pared del intestino grueso superior	$2,11 \times 10^{-1}$
30	pared del corazón	$6,22 \times 10^{-2}$
	riñones	$1,86 \times 10^{-1}$
	hígado	$7,46 \times 10^{-2}$
	pulmones	$7,04 \times 10^{-2}$
	tejido muscular	$8,71 \times 10^{-2}$
35	ovarios	$8,07 \times 10^{-1}$
	páncreas	$1,15 \times 10^{-1}$
	médula ósea	$9,11 \times 10^{-2}$
	superficie de los huesos	$9,74 \times 10^{-2}$
	piel	$7,20 \times 10^{-2}$
40	bazo	$7,11 \times 10^{-2}$
	testículos	$2,38 \times 10^{-1}$
	timo	$8,55 \times 10^{-1}$
	tiroides	$8,54 \times 10^{-2}$
	pared de la vejiga urinaria	$7,19 \times 10^{-1}$
45	útero	$4,72 \times 10^{-1}$
	todo el cuerpo	$8,78 \times 10^{-2}$
	dosis eficaz equivalente	$3,60 \times 10^{-1}$
	dosis eficaz	$3,21 \times 10^{-1}$

50 **[0094]** Se concluyó que la médula ósea y los órganos reproductivos (ovarios/útero y testículos) serían los órganos limitantes de la dosis. Sin embargo, la ventana terapéutica basada en los cálculos dosimétricos pareció favorable y prometedora. Se encontró un cociente entre las dosis en el tumor y en la médula ósea de 18. Por lo tanto, la dosis de ¹³¹I-L19-SIP suministrada al tumor fue, de manera notable, 18 veces mayor que la dosis suministrada a la médula ósea.

55

1.7 Estudio del tratamiento tumoral después de una única inyección i. v. de ¹³¹I-L19-SIP en ratones sin pelo con tumores

[0095] El compuesto ¹³¹I-L19-SIP se inyectó una vez por vía intravenosa en ratones sin pelo (peso corporal de

aproximadamente 27 g) con U251 (glioblastoma). Las dosis investigadas fueron 37 MBq y 74 MBq, respectivamente. Además se investigó un grupo control de animales (a los que se inyectó una vez disolución salina fisiológica). Durante los días después de la inyección se determinó el tamaño del tumor (dado en mm²) con un calibrador.

5 **[0096]** El crecimiento de los tumores U251 en ratones sin pelo controlados después de una única inyección intravenosa de disolución salina fisiológica y de ¹³¹I-L19-SIP, respectivamente, se muestra en la figura 6.

10 **[0097]** Una única inyección de ¹³¹I-L19-SIP con 74 MBq por animal mostró un efecto pronunciado sobre el crecimiento de los tumores U251, que resultó en una estasis durante 18 días. Lo mismo ocurrió con el grupo de dosis baja (37 MBq), excepto por un ligero crecimiento tumoral que se inició durante los últimos cinco días en el grupo de dosis baja. En comparación, los tumores del grupo de control crecieron continuamente durante todo el periodo de observación.

15 **[0098]** Los resultados de esta investigación demuestran el excelente potencial de ¹³¹I-L19-SIP para el tratamiento de tumores sólidos.

1.8 Obtención de imágenes de ¹²³I-L19-SIP después de una única inyección i.v. en ratones sin pelo con tumores (comparación)

20 **[0099]** La sustancia se inyectó por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 9,25 MBq en ratones sin pelo (peso corporal de aproximadamente 25 g) con F9 (teratocarcinoma). Se obtuvieron imágenes mediante una cámara gamma a diversos tiempos después de la administración de la sustancia.

25 **[0100]** El tumor pudo representarse claramente mediante escintografía planar de ¹²³I-L19-SIP en los ratones sin pelo con tumores F9 (teratocarcinoma) 4 h después de la inyección y 24 h después de la inyección. A las 4 h después de la inyección, aparte de la intensa absorción en el tumor solamente pudo detectarse una ligera señal de fondo en el resto del cuerpo (no asociada a un órgano concreto, sino derivada de la sangre en conjunto). Mientras que la señal en el tumor se mantuvo, la señal de fondo en el resto del cuerpo desapareció con el tiempo. Por lo tanto, a las 24 h después de la inyección solamente pudo detectarse el tumor.

30 **[0101]** Los resultados de esta investigación demuestran el excelente potencial de ¹²³I-L19-SIP para la obtención de imágenes de tumores sólidos.

2. Otros ejemplos y experimentos

Materiales y procedimientos

Preparación y expresión de construcciones de scFv, inmunoproteína pequeña (SIP) e IgG1

40 *scFv (comparación)*

45 **[0102]** El scFv(L19) (figura 1A) es un fragmento de anticuerpo madurado por afinidad ($K_d = 5,4 \times 10^{-11}$ M) dirigido específicamente contra el dominio ED-B de fibronectina (13 Pini y col., 1998). Como control se usó scFv(D1.3) (7 McCafferty y col.; 26 Neri y col., 1997), un scFv de ratón dirigido contra lisozima de clara de huevo de gallina. Estos scFv se expresaron en la cepa HB2151 de *E. coli* (Maxim Biotech, San Francisco, CA, EE. UU.), según Pini y col. (34 1997).

Miniinmunoglobulina

50 **[0103]** Para la construcción del gen de la inmunoproteína pequeña de L19 (L19-SIP) (figura 1C), la secuencia de ADN que codifica scFv(L19) se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la polimerasa de ADN Pwo (Roche) según las recomendaciones del fabricante, con los cebadores BC-618 (gtgtgcactcggaggtgcagctgttgagctctggg - SEQ ID NO. 8) y BC-619 (gcctccggatttgattccaccttggtcccttgccc - SEQ ID NO. 9) que contienen sitios de restricción para *Apa*I y *Bsp*Ei, respectivamente. El producto de amplificación se insertó como fragmento *Apa*Li/*Bsp*Ei en el vector pUT-SIP, que proporciona el gen de scFv con una señal de secreción requerida para la secreción de proteínas al medio extracelular. El vector pUT-εSIP se obtuvo a partir del vector descrito previamente pUT-SIP-largo (33 Li y col., 1997) después de sustituir el dominio constante humano γ1-CH3 por el dominio CH4 de la isoforma secretora de la IgE humana IgE-S2 (ε_{S2}-CH4; 35 Batista y col., 1996). CH4 es el dominio que permite la dimerización de la molécula de IgE y la isoforma ε_{S2} contiene una cisteína en el extremo

carboxiterminal que estabiliza el dímero de IgE a través de un puente disulfuro intercatenario. En la molécula final de SIP, scFv(L19) se conectó con el dominio ϵ_{S2} -CH4 mediante un enlazante de poca longitud GGSG. Después, el gen de SIP se escindió del plásmido pUT- ϵ SIP-L19 con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* y se clonó en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos), que contiene el promotor de citomegalovirus (CMV), para obtener la construcción pcDNA3-L19-SIP.

5 [0104] La secuencia de ADN codificante de scFv(D1.3) se amplificó con los cebadores BC-721 (ctcgtgcactgcaggtgcagctgcaggagtc - SEQ ID NO. 10) y BC-732 (ctctccggaccgtttgatctgcgcgttgg - SEQ ID NO. 11) y se insertó como fragmento *ApaI*/*BspEI* en el vector pUT- ϵ SIP. Después, el gen de D1.3-SIP se escindió del plásmido pUT- ϵ SIP-D1.3 con *HindIII* y *EcoRI* y se clonó en pcDNA3 para obtener la construcción pcDNA3-D1.3-SIP.

10 [0105] Estas construcciones se usaron para transfectar células de mieloma murino SP2/0 (ATCC, Colección americana de cultivos tipo, Rockville, MD, EE. UU.) con el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche), siguiendo el protocolo para células adherentes optimizado por el fabricante. Los transfectomas se cultivaron en medio DMEM suplementado con FCS al 10% y se seleccionaron con 750 μ g/ml de geneticina (G418, Calbiochem, San Diego, CA, EE. UU.).

IgG1 (comparación)

20 [0106] Para preparar la *IgG1* completa, la región variable de la cadena pesada de L19 (L19-VH) junto con su secuencia peptídica de secreción se escindió con *HindIII* y *XhoI* de la construcción previamente descrita L19-pUT- ϵ SIP y se insertó en el vector pUC-*IgG1* que contiene el gen completo de la región constante de la cadena pesada γ 1 humana. Después, el gen de *IgG1* recombinante se escindió de pUC-*IgG1*-L19-VH con *HindIII* y *EcoRI* y se clonó en pcDNA3 para obtener la construcción pcDNA3-L19-*IgG1*.

25 [0107] Para la preparación de la cadena ligera completa de L19 se amplificó L19-VL a partir de L19-pUT- ϵ SIP (descrito anteriormente) por PCR con los cebadores BC-696 (tggtgtgcactcggaaattgtgtgacgcagc - SEQ ID NO. 12) y BC-697 (ctctcgtacgtttgattccaccttggcc - SEQ ID NO. 13) que contienen sitios de restricción para *ApaI* y *BsWI*, respectivamente. Después de la digestión con *ApaI* y *BsWI*, el producto de amplificación se insertó en el vector pUT-SEC-hC κ que contiene la secuencia señal de secreción y la secuencia del dominio constante de la cadena ligera κ humana. Después, el gen de la cadena ligera recombinante se escindió de pUT-SEC-hC κ -L19-VL con *HindIII* y *XhoI* y se insertó en el vector de expresión en mamíferos pCMV2A, derivado del vector pcDNA3 por eliminación del gen de resistencia a G418, para obtener la construcción pCMV2A-L19- κ .

30 [0108] Se usaron cantidades equimolares de estas construcciones para transfectar simultáneamente células SP2/0 de mieloma murino según se describe anteriormente. Los clones seleccionados con geneticina se analizaron mediante ELISA en cuanto a su capacidad de segregar inmunoglobulina quimérica, completa con las cadenas pesada y ligera.

35 [0109] Todas las construcciones de ADN se purificaron mediante el sistema Maxiprep de Qiagen (Hilden, Alemania) y las secuencias de ADN de las dos hebras de las construcciones se confirmaron mediante el kit de reacción preparada para la secuenciación cíclica con terminadores marcados con d-rodamina con el sistema ABI PRISM (Perkin Elmer, Foster City, CA, EE. UU.). Todas las enzimas de restricción se obtuvieron de Roche Diagnostics (Milán, Italia), con la excepción de *BsWI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EE. UU.). Después de la digestión con enzimas de restricción, los insertos y los vectores se recuperaron de geles de agarosa con el procedimiento Qiaquick (Qiagen).

Purificación y control de calidad de los anticuerpos

40 [0110] Para la purificación de los distintos anticuerpos se llevó a cabo una cromatografía de inmunoafinidad según el procedimiento descrito por Carnemolla y col. (24 1996).

45 [0111] Para la inmunopurificación de todos los diferentes formatos del anticuerpo L19 se usó el dominio ED-B conjugado con sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) según las instrucciones del fabricante (24 Carnemolla y col., 96), mientras que para los anticuerpos D1.3 se usó una columna de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma, San Luis, USA) conjugada con sefarosa 4B (Amersham Pharmacia).

[0112] Los formatos de anticuerpo L19-SIP y L19-*IgG1* inmunopurificados no requirieron una purificación

adicional y se dializaron contra PBS pH 7,4 a +4°C. Dado que los scFv obtenidos de la cromatografía de inmunoafinidad están compuestos de dos formas, monomérica y dimérica, para aislar esta última forma se requirió una segunda etapa de purificación, según se describe por Demartis y col. (27 2001). Se prepararon lotes de los distintos formatos de anticuerpo y se analizaron mediante experimentos de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, inmunohistoquímica, cromatografía de exclusión por tamaños (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) y ELISA.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), cromatografía de exclusión por tamaños e inmunohistoquímica

10

[0113] Los experimentos de cribado por ELISA en los medios de cultivo acondicionados se realizaron según Carnemolla y col. (24 1996). Para poner de manifiesto la expresión de los distintos formatos del anticuerpo L19, el fragmento recombinante 7B89 (24 Carnemolla y col., 1996) que contiene el dominio ED-B de FN que incluye el epítipo reconocido por L19 se inmovilizó en inmunoplasmas Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Para detectar los anticuerpos D1.3 en experimentos de ELISA se inmovilizó lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma) sobre placas EIA con superficie de NH₂ (Costar, Cambridge, MA, EE. UU.). Un anticuerpo de conejo dirigido contra IgE humana y conjugado con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.), diluido según las recomendaciones del fabricante, se usó como anticuerpo secundario para detectar las SIP. En el caso de IgG1 se usó un anticuerpo de conejo dirigido contra IgG humana, conjugado con peroxidasa (Pierce). Para los scFv con la secuencia marcadora FLAG se usaron un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra FLAG humana (M2, Kodak) y un anticuerpo de cabra dirigido contra ratón, conjugado con peroxidasa (Pierce) como anticuerpos secundario y terciario, respectivamente. En todos los casos, la inmunorreactividad con el antígeno inmovilizado se detectó mediante el sustrato ABTS para la peroxidasa (Roche) y se midió la absorbancia fotométrica a 405 nm.

15

20

25

[0114] Una columna de cromatografía de Superdex 200 (Amersham Pharmacia) se usó para analizar los perfiles de filtración en gel de los anticuerpos purificados en condiciones nativas mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC; Amersham Pharmacia). El análisis inmunohistoquímico en distintas secciones tisulares de criostato se realizó según se describe por Castellani y col. (22 1994) y el análisis por SDS-PAGE con un gradiente del 4-18% se llevó a cabo según Carnemolla y col. (17 1989) en condiciones reductoras y no reductoras..

30

Líneas de animales y células

[0115] Se obtuvieron ratones atímicos sin pelo (8 semanas de edad, hembras CD1 sin pelo/sin pelo) de Harlan Italy (Correzzana, Milán, Italia) y ratones de la cepa 129 (clon SvHsd) (8-10 semanas de edad, hembras) de Harlan UK (Oxon, Inglaterra). Las células de teratocarcinoma embrionario de ratón (F9), las células derivadas de melanoma humano (SK-MEL-28) y las células de mieloma de ratón (SP2/0) se adquirieron de la Colección americana de cultivos tipo (Rockville, MD, EE. UU.). Para la inducción de tumores, se inyectaron por vía subcutánea 16×10^6 células SK-MEL-28 a los ratones sin pelo y 3×10^6 células F9 a los ratones de la cepa 129. El volumen del tumor se determinó con la fórmula siguiente: $(d)^2 \times D \times 0,52$, en que d y D son, respectivamente, las dimensiones menor y mayor (cm) del tumor medidas con un calibrador. La estabulación, los tratamientos y el sacrificio de los animales se llevaron a cabo según la legislación nacional (Ley italiana n° 116 del 27 de enero de 1992) concerniente a la protección de los animales usados para fines científicos.

35

40

Radioyodación de anticuerpos recombinantes (comparación)

45

[0116] La radioyodación de las proteínas se realizó por el método indirecto de Chizzonite (36 Riske y col., 1991) con tubos de yodación prerrecubiertos con IODOGEN para activar Na¹²⁵I (NEN Life Science Products, Boston MA, EE. UU.), según las recomendaciones del fabricante. En los experimentos descritos se usó 1,0 mCi de Na¹²⁵I por 0,5 mg de proteína. Las moléculas radiomarcadas se separaron del ¹²⁵I libre mediante columnas PD10 (Amersham Pharmacia) pretratadas con BSA al 0,25% y equilibradas en PBS. La radioactividad de las muestras se determinó mediante un contador γ de cristal (Packard Instruments, Milán, Italia). El ensayo de inmunorreactividad de la proteína radiomarcada se realizó en una columna de 200 μ l de sefarosa con ED-B, saturada con BSA al 0,25% en PBS. Una cantidad conocida de anticuerpo radioyodado, en 200 μ l de BSA al 0,25% en PBS, se aplicó en la parte superior y se dejó penetrar en la columna. La columna se lavó después con 1,5 ml de BSA al 0,25% en PBS para eliminar los anticuerpos unidos de manera no específica. Finalmente, el material inmunorreactivo unido se eluyó con 1,5 ml de TEA 0,1 M, pH 11. Se determinó la radioactividad del material unido y sin unir y se calculó el porcentaje de anticuerpos inmunorreactivos. La inmunorreactividad fue siempre superior a 90%.

50

55

[0117] Para analizar adicionalmente los anticuerpos radioyodados, se cargó una cantidad conocida de

proteína radioyodada en 200 µl en la columna de Superdex 200. El volumen de retención de las distintas proteínas no varió después de la radioyodación. La recuperación de radioactividad de la columna de Superdex 200 para los tres formatos del anticuerpo L19 radioyodados y sus controles negativos fue del 100% (figuras 3A, 3B y 3C).

5 Experimentos de biodistribución (comparación)

[0118] Para bloquear la acumulación no específica de ^{125}I en el estómago y su concentración en el tiroides, los ratones recibieron por vía oral 20 mg de perclorato de sodio (Carlo Erba, Italia) en agua, 30 min antes de la inyección de los anticuerpos radiomarcados. Este procedimiento se repitió a intervalos de 24 h durante la duración de los experimentos de biodistribución. Se inyectaron 0,1 nmol de los distintos anticuerpos radiomarcados (correspondientes a 6 µg de scFv, 8 µg de SIP y 18 µg de IgG) en 100 µl de disolución salina en la vena de la cola de los ratones con tumores. Por cada punto de tiempo se sacrificaron tres animales y se extrajeron los diferentes órganos, incluyendo el tumor, que se pesaron, se sometieron a conteo en un contador γ y después se fijaron con formaldehído al 5% en PBS, pH 7,4, para su procesamiento para microautorradiografías, realizadas según Tarli y col. (23 1999).

[0119] La sangre se recogió también para la preparación de plasma con el fin de determinar la estabilidad de las moléculas radiomarcadas en la corriente sanguínea mediante la prueba de inmunorreactividad descrita anteriormente y el análisis de filtración en gel. En ambos casos se usaron 200 µl de plasma. El contenido de radioactividad en los diferentes órganos se expresó como porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% ID/g).

[0120] Los parámetros de aclaramiento sanguíneo de los anticuerpos radioyodados se ajustaron mediante un procedimiento de mínimos cuadrados, con el programa Kaleidagraph para MacIntosh (Synergy Software, Reading, PA, EE. UU.) y la ecuación:

$$X(t) = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t)$$

en que X (t) es el % ID/g de anticuerpo marcado en el tiempo t. Esta ecuación describe un perfil de aclaramiento sanguíneo biexponencial, en el que la amplitud de la fase α se define como $A \times 100/(A+B)$ y la amplitud de la fase de eliminación β se define como $B \times 100/(A+B)$. Los parámetros α y β son parámetros de velocidad relacionados con las semividas de las fases de aclaramiento sanguíneo correspondientes. $T_{1/2}(\text{fase } \alpha) = \ln 2/\alpha = 0,692.../\alpha$, $T_{1/2}(\text{fase } \beta) = \ln 2/\beta = 0,692.../\beta$. Se supuso que X (0) es igual al 40%, correspondiente a un volumen de sangre de 2,5 ml en cada ratón.

Resultados

35 Preparación de anticuerpos

[0121] Uso de las regiones variables de los distintos formatos de anticuerpo (scFv, miniinmunoglobulina e IgG1 humana completa) de L19 (13 Pini y col., 1998) y su rendimiento *in vivo* en el reconocimiento de la vasculatura tumoral como diana. La miniinmunoglobulina es de acuerdo con la invención, scFv e IgG1 son comparativos.

[0122] La figura 1 muestra las construcciones usadas para expresar los diferentes formatos del anticuerpo L19. Otras construcciones similares se prepararon con las regiones variables del scFv específico para un antígeno no pertinente (D1.3; 7 McCafferty; 26 Neri y col., 1997).

[0123] Para obtener SIP e IgG1, se transfectaron células de mieloma murino SP2/0 con las construcciones mostradas en la figura 1 y los transfectomas estables se seleccionaron con G418. Los mejores productores se determinaron mediante ELISA y estos clones se amplificaron para la purificación de anticuerpos. La purificación de los tres formatos de anticuerpos de L19 se basó en cromatografía de inunoafinidad con ED-B recombinante conjugado con sefarsa. Los rendimientos fueron de aproximadamente 8 mg/l para scFv(L19), 10 mg/ml para L19-SIP y 3 mg/l para L19-IgG1. Como proteínas de control se usaron: scFv(D1.3), específico para lisozima de huevo de gallina y D1.3-SIP, construido con las regiones variables de scFv D1.3. Estos dos anticuerpos se purificaron sobre lisozima de huevo de gallina conjugada con sefarsa. Los rendimientos fueron de 8 y 5 mg/l, respectivamente. Como control para L19-IgG1 se usó IgG1/ κ humana disponible en el comercio (Sigma).

[0124] Se realizó un análisis por SDS-PAGE de los tres formatos de L19 purificados, tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Según lo esperado, el peso aparente de scFv(L19) fue de aproximadamente 28 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras (no se muestra). L19-SIP mostró un peso molecular de aproximadamente 80 kDa en condiciones no reductoras y de aproximadamente 40 kDa en condiciones reductoras. Los resultados demostraron que más del 95% de las moléculas nativas están presentes como dímeros unidos

covalentemente. Según lo esperado, L19-IgG1 mostró una banda principal de aproximadamente 180 kDa en condiciones no reductoras, mientras que en condiciones reductoras mostró dos bandas correspondientes a la cadena pesada de aproximadamente 55 kDa y a la cadena ligera de aproximadamente 28 kDa. Se obtuvieron los perfiles de elución de los tres formatos del anticuerpo L19, analizados por cromatografía de exclusión por tamaños (Superdex 200). En los tres casos se detectó un pico único con una distribución normal y que representó más del 98%. Mediante el uso de una curva de calibración estándar, los pesos moleculares aparentes fueron de 60 kDa para scFv(L19)₂, 80 kDa para L19-SIP y 180 kDa para L19-IgG1. Además, se demostró la ausencia de agregados moleculares que están presentes con frecuencia en las preparaciones de proteínas recombinantes y que pueden invalidar los resultados obtenidos en estudios *in vivo*. Los experimentos de SDS-PAGE y cromatografía de exclusión por tamaños (Superdex 200) llevados a cabo en las proteínas de control purificadas dieron resultados similares.

[0125] Con estos tres formatos diferentes del anticuerpo L19 se llevaron a cabo análisis inmunohistoquímicos en secciones de criostato de melanoma humano SK-MEL-28 inducido en ratones sin pelo y de teratocarcinoma murino F9 inducido en ratones de la cepa 129. Los resultados óptimos se obtuvieron con concentraciones tan bajas como 0,25-0,5 nM. Los tres anticuerpos L19 purificados reconocieron estructuras idénticas.

Estabilidad in vivo de los formatos del anticuerpo L19 radiomarcados

[0126] Para estudios de biodistribución *in vivo* se usaron melanoma humano SK-MEL-28 y teratocarcinoma murino F9. El tumor SK-MEL-28 tiene una velocidad de crecimiento relativamente baja, mientras que el tumor F9 crece rápidamente (figura 2). Por lo tanto, el uso del tumor SK-MEL-28 permitió experimentos de larga duración (hasta 144 horas), mientras que el tumor F9 se indujo para estudios de biodistribución breves (hasta 48 horas). Todos los experimentos de biodistribución se realizaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 0,1-0,3 cm³. Para comparación de los diversos formatos de anticuerpo se inyectaron cantidades equimolares (0,1 nmol) en 100 µl de disolución salina estéril. Antes de la inyección, los compuestos radioyodados se filtraron a 0,22 µm y se comprobó la inmunorreactividad y el perfil de filtración en gel (véase la sección de materiales y procedimientos). La inmunorreactividad de las proteínas marcadas fue siempre superior al 90%.

[0127] La figura 3 A-C expone los perfiles del análisis de filtración en gel (Superdex 200) de los formatos radioyodados del anticuerpo L19.

[0128] Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados a distintos intervalos de tiempo desde la inyección y la radioactividad presente en el plasma se analizó por inmunorreactividad y por cromatografía de filtración en gel. Los perfiles de filtración en gel mostraron un pico principal único con el peso molecular de la proteína inyectada para los tres formatos del anticuerpo L19. Solamente el perfil de scFv mostró un segundo pico con un peso molecular superior, lo que sugiere la formación de agregados (figura 3 D-F). Además, para scFv(L19)₂ se observó la formación de agregados de alto peso molecular que no se eluyen de la columna de Superdex 200. De hecho, mientras que para L19-SIP y L19-IgG la recuperación de la radioactividad aplicada a la columna de Superdex 200 fue del 90-100%, el rendimiento respecto a la radioactividad cargada de scFv(L19)₂ fue de aproximadamente el 55%. La radioactividad retenida se recuperó solamente después de lavar la columna cromatográfica con NaOH 0,5 M, lo que demuestra que había agregados de gran tamaño bloqueados en el filtro de la columna (tabla 1).

[0129] La tabla 1 expone también los resultados de la prueba de inmunorreactividad realizada en plasma (véase la sección de materiales y procedimientos). Durante el tiempo de los experimentos, L19-SIP y L19-IgG1 mantuvieron la misma inmunorreactividad en el plasma que los reactivos de partida. Por el contrario, solo 3 horas después de la inyección la inmunorreactividad de scFv(L19)₂ en el plasma se redujo a menos del 40%.

Experimentos de biodistribución comparativos

[0130] Las tablas 2 a, b, c y la figura 4 exponen los resultados obtenidos en los experimentos de biodistribución con los anticuerpos L19 radiomarcados en ratones con tumores SK-MEL-28.

[0131] Las tablas 2 a, b, c muestran la media (\pm SD) del % ID/g de los tejidos y órganos, incluyendo los tumores, a tiempos diferentes desde la inyección i.v. de los anticuerpos radiomarcados.

[0132] En la figura 4 se representan las variaciones del % ID/g de los diferentes formatos de anticuerpo en el tumor (A) y en la sangre (B) en los distintos tiempos de los experimentos, así como los cocientes (C) entre los % ID/g en el tumor y en la sangre. Los tres formatos del anticuerpo L19 se acumularon selectivamente en el tumor y el cociente entre el % ID/g del tumor y de otros órganos se exponen en la tabla 3. Según se demuestra por

microautorradiografía, los anticuerpos se acumulan solamente en la vasculatura del tumor, mientras que no se observó ninguna acumulación específica en la vasculatura de los órganos normales. En contraste, no se encontró ninguna acumulación específica de las moléculas de control radioyodadas ni en los tumores ni en los tejidos normales (tablas 2 a, b, c).

5

[0133] Los tres formatos del anticuerpo L19 mostraron un aclaramiento principalmente renal, según se determinó por el conteo de las muestras de orina. Según lo esperado, la velocidad de aclaramiento fue más rápida para scFv(L19)2 y más lenta para la L19-IgG1 completa. El ajuste de la curva con una función biexponencial dio los valores de semivida expuestos en la tabla 4.

10

[0134] La figura 5 representa las variaciones del % ID/g (\pm SD) del tumor y la sangre obtenidos con scFv(L19)2 y L19-SIP radioyodados con el modelo tumoral del teratocarcinoma F9. Debido a la elevada actividad angiogénica del teratocarcinoma F9, la acumulación de moléculas radioactivas en este tumor fue de tres a cuatro veces mayor que en el tumor SK-MEL-28, 3 y 6 h después de la inyección i.v. y fue persistentemente mayor durante las 48 h de duración del experimento. En cuanto al tumor SK-MEL-28, la acumulación específica en la vasculatura tumoral se confirmó por microautorradiografía, mientras que no se observó ninguna acumulación específica en el tumor después de la inyección de las moléculas de control. En la tabla 5 se exponen los % ID/g de L19(scFv) y L19-SIP a distintos tiempos después de la inyección i.v. en los tumores F9 y en otros órganos.

15

20 *Síntesis de L19-SIP reducido*

[0135] A una disolución de 375 μ g (5 nmol) de L19-SIP en 422 μ l de PBS se añadieron 50 μ l de una disolución de TCEP (14,34 mg de TECPxHCl / 5 ml de Na₂HPO₄ acuoso 0,1 M, pH 7,4). La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 1 h a 37°C. El L19-SIP reducido se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS). El análisis por SDS-PAGE del producto aislado demostró la transformación cuantitativa de L19-SIP en L19-SIP reducido.

25

[0136] Rendimiento: 100,3 μ g/200 μ l de PBS (26,7%).

30 *Síntesis de ^{99m}Tc-L19-SIP (comparación)*

[0137] Se pusieron 3,0 mg de L-tartrato de sodio en un vial, se añadieron 100,3 μ g de L19-SIP reducido en 200 μ l de PBS y la disolución se diluyó con 100 μ l de un tampón de H₂HPO₄ acuoso (1 M, pH 10,5). Se añadieron 85 μ l de eluido del generador de ^{99m}Tc (24 h) y 10 μ l de una disolución de SnCl₂ (5 mg de SnCl₂/1 ml de HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h a 37°C. El compuesto L19-SIP marcado con ^{99m}Tc se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).

35

Rendimiento radioquímico: 35,6%.
Pureza radioquímica: 90,2% (SDS-PAGE).
Actividad específica: 26,4 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 91,4%.

40

Síntesis de ^{99m}Tc-MAG₂-L19-SIP-disulfuro de carboximetil-t-butilo (comparación)

[0138] Una disolución de 21,75 ml (0,312 mol) de ácido 1-mercaptoacético, 43,5 ml (0,312 mol) de trietilamina y 100 g (0,312 mol) de *N*-(*tert*-butiltio)-*N,N'*-di-BOC-hidrazina en 1 l de EtOH (abs.) se calentó a reflujo (en atmósfera de N₂) durante 60 h. El EtOH se evaporó a presión reducida hasta un volumen final de aproximadamente 200 ml. El residuo se añadió sobre 1,8 l de H₂O y el pH de la suspensión resultante se ajustó a 7,14 con NaOH 5 M. La di-BOC-hidrazina se separó por filtración y el pH de la disolución resultante se ajustó a 2,2 con HCl semiconcentrado. El material crudo se extrajo del agua tres veces con 600 ml de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener 41,1 g (80%) como un aceite amarillo. El material fue suficientemente puro para síntesis posteriores.

45

50

*Éster *t*-butílico de *N*-(benciloxycarbonil-Gly)Gly (éster *t*-butílico de *Z*-(*N*-Gly)Gly)*

[0139] Una disolución de 35,02 g (114 mmol) de *Z*-Gly-O-succinimida y 15 g (114 mmol) de Gly-O-^tBu en 1,4 l de CH₂Cl₂ se agitó en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente durante 20 h. La fase orgánica se lavó tres veces con 250 ml de ácido cítrico acuoso al 1%, dos veces con 200 ml de NaHCO₃ acuoso semisaturado y una vez con 200 ml de agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación del CH₂Cl₂ a presión reducida dio 36,5 g (99%) de *Z*-Gly-Gly-O-^tBu como un aceite amarillo. El material crudo fue suficientemente puro para síntesis

55

posteriores.

*Éster *t*-butílico de Gly-Gly*

- 5 **[0140]** Se disolvieron 36,5 g (113 mmol) de Z-Gly-Gly-O^tBu en 1 l de THF y después se añadieron 3,65 g de paladio sobre carbón (10%). La mezcla se agitó en atmósfera de H₂ (1 atm = 101,3 kPa) durante 3 h a temperatura ambiente. La suspensión se purgó con N₂, se filtró (filtro de PTFE: 0,45 µm) y el filtrado se concentró a presión reducida para dar 20,3 g (95%) de Gly-Gly-O^tBu como un aceite amarillo. El material crudo fue suficientemente puro para síntesis posteriores.

10

*Éster *t*-butílico de glicilglicina y disulfuro de carboximetil-*t*-butilo*

- 15 **[0141]** Una disolución de 23,85 g (115,6 mmol) de DCC en 430 ml de CH₂Cl₂ se añadió gota a gota a una disolución de 21,76 g (115,6 mmol) de Gly-Gly-O^tBu, 20,84 g (115,6 mmol) de disulfuro de carboximetil-*t*-butilo y 13,3 g (115,6 mmol) de NHS en 1 l de CH₂Cl₂. La suspensión resultante se agitó durante la noche en atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. Después de la filtración, la disolución resultante se lavó tres veces con 400 ml de NaHCO₃ acuoso semisaturado y una vez con 400 ml de agua. La fase orgánica seca (MgSO₄) se evaporó a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice con un gradiente de disolvente desde CH₂Cl₂/MeOH 99:1 hasta CH₂Cl₂/MeOH 98,5:1,5. Se aislaron 26,1 g (64%) como un aceite amarillo.

20

Mercaptoacetilglicilglicina

- 25 **[0142]** Se disolvieron 26,32 g (75,09 mmol) de éster *t*-butílico de glicilglicina y disulfuro de carboximetil-*t*-butilo en 233 ml de TFA en atmósfera de N₂. La disolución resultante se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. El TFA se evaporó a presión reducida (5-10 x 10⁻² hPa) y el aceite resultante se secó en agitación durante 2 h más (5-10 x 10⁻² hPa). Después de la adición de 250 ml de Et₂O precipitó un polvo blanco y la suspensión se agitó durante 3 h. El material se separó por filtración y se resuspendió en 100 ml de EtO₂. La suspensión resultante se agitó durante la noche, el producto se separó por filtración y el material se secó a temperatura ambiente y presión reducida para dar 20,46 g (92,5%) como un polvo blanco.

30

Éster de NHS y mercaptoacetilglicilglicina

- 35 **[0143]** Los compuestos mercaptoacetilglicilglicina (1 g, 3,4 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (391 mg, 3,4 mmol) se combinaron en un matraz de fondo redondo y se disolvieron en DMF anhidra (4 ml). Se añadió DCC (700 mg, 3,4 mmol) en dioxano anhidro (2 ml) mientras se agitaba la mezcla de reacción. A los 15 min comenzó a formarse un precipitado (DCU). Después de 1 h, el precipitado se separó por filtración al vacío y se lavó con dioxano frío. El dioxano se eliminó del filtrado. El producto se precipitó a partir de la disolución de DMF restante mediante la adición de dietiléter. El producto se aisló por filtración, se lavó con dietiléter frío y se secó durante la noche en un desecador de vacío. Rendimiento: 1,33 (99%).

40

Síntesis de ^{99m}Tc-MAG₂-ε-HN(Lys)-L19-SIP (comparativo)

- 45 **[0144]** Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP sin reducir en 111 µl de PBS con 300 µl de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializó dos veces durante 1 h con 200 ml de tampón de fosfato (0,1 M, pH 8,5) mediante un dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se añadieron 50 µl de una disolución de éster de NHS y mercaptoacetilglicilglicina (0,50 mg disueltos en 500 µl de tampón de fosfato, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 3 h. La mezcla de reacción se dializó dos veces durante 1 h y una vez durante 17 h (durante la noche) con 200 ml de tampón de fosfato (0,1 M, pH 8,5) cada vez, mediante el dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se añadieron 3,0 mg de L-tartrato de disodio al vial y después se añadieron 90 µl del eluido del generador de ^{99m}Tc (eluido diariamente) y 25 µl de una disolución de SnCl₂ (5 mg de SnCl₂/1 ml de HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó a 37°C durante 0,5 h. El compuesto L19-SIP marcado con ^{99m}Tc se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).

55

Rendimiento radioquímico: 55,1%.
 Pureza radioquímica: 94,5% (SDS-PAGE).
 Actividad específica: 15,2 MBq/nmol.
 Inmunorreactividad: 81,1%.

Síntesis de ¹⁸⁸Re-L18-SIP (comparación)

[0145] Se pusieron 3,0 mg de L-tartrato de disodio en un vial y después se añadieron 150 µg de L19-SIP-SH reducido en 310 µl de PBS y la disolución se diluyó con 100 µl de tampón de Na₂HPO₄ acuoso (1 M, pH 10,5). Se añadieron 100 µl de eluido del generador de ¹⁸⁸Re y 50 µl de una disolución de SnCl₂ (5 mg de SnCl₂/1 ml de HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó a 37°C durante 1,5 h. El compuesto L19-SIP marcado con ¹⁸⁸Re se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).

5
10 Rendimiento radioquímico: 34,8%.
Pureza radioquímica: 97,2% (SDS-PAGE).
Actividad específica: 13,5 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 91,7%.

Síntesis de L19-SIP reducido para su conjugación específica con EDTA, CDTA, TETA, DTPA, TTHA, HBED, DOTA, NOTA, DO3A y quelantes de tipo similar al grupo SH de cisteína

15 **[0146]** Se añadieron 50 µl de una disolución de TCEP (14,34 mg de TCEPxHCl/5 ml de Na₂HPO₄ acuoso, 0,1 M, pH 7,4) a una disolución de 375 µg (5 nmol) de L19-SIP en 422 µl de PBS. La mezcla de reacción se agitó suavemente a 37°C durante 1 h. El compuesto L19-SIP reducido se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: tampón de acetato de sodio, 0,1 M, pH 5,0). El análisis por SDS-PAGE del producto aislado demostró la transformación cuantitativa de L19-SIP en L19-SIP reducido. Rendimiento: 105,7 µg/200 µl (28,2%).

20 *Síntesis de ¹¹¹In-MX-DTPA-maleimida-S(Cys)-L19-SIP-R (R = reducido) (comparación)*

25 **[0147]** Se hicieron reaccionar 105 µg (2,8 nmol) de L19-SIP reducido en 200 µl de tampón de acetato de sodio (0,1 M, pH 5) con 50 µl de 1,4,7-triaza-2-(*N*-maleimidoetilen-*p*-amino)bencil-1,7-bis(carboximetil)-4-carboximetil-6-metilheptano disuelto (0,25 mg de DTPA-maleimida en 500 µl de tampón de acetato de sodio, 0,1 M, pH 5) a 37°C durante 3 h. La mezcla de reacción se dializó dos veces durante 1 h con 200 ml de una disolución de acetato de sodio (0,1 M, pH 6) mediante un dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se añadieron 80 µl de una disolución de [¹¹¹In]InCl₃ (HCl 1N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min.

30 **[0148]** El compuesto DTPA-maleimida-S(Cys)-L19-SIP marcado con ¹¹¹In se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).
35 Rendimiento radioquímico: 51,6%.
Pureza radioquímica: 97,2% (SDS-PAGE).
Actividad específica: 7,9 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 88,5%.

40 *Síntesis de MX-DTPA-maleimida (1,4,7-triaza-2-(*N*-maleimidoetilen-*p*-amino)bencil-1,7-bis(carboximetil)-4-carboximetil-6-metilheptano*

45 **[0149]** Una cantidad de 512 mg (1 mmol) de ácido {[3-(4-aminofenil)-2-(biscarboximetilamino)propil]-[2-(biscarboximetilamino)propil]amino}acético (Macrocylics Inc. Dallas, TX, EE. UU.) y 707 mg (7 mmol) de trietilamina se disolvieron en 3 ml de DMF seca. Se añadieron gota a gota 400 mg (1,5 mmol) de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico (Aldrich) en 1 ml de DMF seca. La disolución se agitó durante 5 h a 50°C. Se añadieron lentamente 30 ml de dietiléter. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min más. El precipitado se recogió por filtración. El producto crudo se purificó por RP-HPLC (acetónitrilo:agua:ácido trifluoroacético de 3:96,9:0,1 a 99,9:0:0,1). Rendimiento: 61% (405 mg, 0,61 mmol). EM-ESI: 664 = M⁺ +1.

50 *Síntesis de ¹¹¹In-MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP (comparación)*

55 **[0150]** Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP sin reducir en 111 µl de PBS con 300 µl de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializó dos veces durante 1 h con 200 ml de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) mediante un dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se añadieron 50 µl de una disolución de 1,4,7-triaza-2-(*p*-isotiocianato)bencil-1,7-bis(carboximetil)-4-carboximetil-6-metilheptano (MX-DTPA) (0,33 mg de MX-DTPA disueltos en 500 µl de tampón de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 3 h. La mezcla de reacción se dializó dos veces durante 1 h y una vez durante 17 h (durante la noche) con 200 ml de tampón de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) cada vez, mediante el dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.).

[0151] Se añadieron 80 µl de una disolución de $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min. El compuesto MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con ^{111}In se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).

- 5 Rendimiento radioquímico: 72,4%.
 Pureza radioquímica: 80,3% (SDS-PAGE).
 Actividad específica: 8,8 MBq/nmol.
 Inmunorreactividad: 77,5%.

10 *Síntesis de ^{111}In -DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP (comparación)*

[0152] Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP sin reducir en 108 µl de PBS con 300 µl de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializó dos veces durante 1 h con 200 ml de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) mediante un dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se añadieron 50 µl de una disolución de ácido 1,4,7,10-tetraaza-2-(p-isotiocianato)bencilciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (bencil-p-SCN-DOTA, Macrocylics Inc., Dallas, TX, EE. UU.) (1,5 mg de bencil-p-SCN-DOTA disueltos en 5 ml de tampón de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) a la disolución y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 3 h. La mezcla de reacción se dializó dos veces durante 1 h y una vez durante 17 h (durante la noche) con 200 ml de tampón de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) cada vez, mediante el dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.).

[0153] Se añadieron 80 µl de una disolución de $[^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$ (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min. El compuesto DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con ^{111}In se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).

- 25 Rendimiento radioquímico: 70,8%.
 Pureza radioquímica: 92,1% (SDS-PAGE).
 Actividad específica: 10,1 MBq/nmol.
 Inmunorreactividad: 75,1%.

30 *Síntesis de ^{88}Y -MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP (comparación)*

[0154] Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP sin reducir en 110 µl de PBS con 300 µl de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializó dos veces durante 1 h con 200 ml de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) mediante un dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se añadieron 50 µl de una disolución de MX-DTPA (0,33 mg de MX-DTPA disueltos en 500 µl de tampón de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 3 h. La mezcla de reacción se dializó dos veces durante 1 h y una vez durante 17 h (durante la noche) con 200 ml de tampón de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) cada vez, mediante el dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.).

[0155] Se añadieron 100 µl de una disolución de $[^{88}\text{Y}]\text{YCl}_3$ (HCl, 1 N, 75 MBq, Oak Ridge National Lab.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min. El compuesto MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con ^{88}Y se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).

- 40 Rendimiento radioquímico: 68,1%.
 Pureza radioquímica: 91,5% (SDS-PAGE).
 45 Actividad específica: 11,4 MBq/nmol.
 Inmunorreactividad: 70,5%.

Síntesis de ^{177}Lu -DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP (comparación)

[0156] Se disolvieron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP sin reducir en 120 µl de PBS con 300 µl de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializó dos veces durante 1 h con 200 ml de tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) mediante un dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Se añadieron 50 µl de una disolución de bencil-p-SCN-DOTA (1,5 mg disueltos en 5 ml de tampón de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 3 h. La mezcla de reacción se dializó dos veces durante 1 h y una vez durante 17 h (durante la noche) con 200 ml de tampón de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) cada vez, mediante el dispositivo Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE. UU.).

[0157] Se añadieron 200 µl de una disolución de $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ (HCl, 1 N, 80 MBq, NRH-Petten, Países Bajos) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min. El compuesto DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP

5 marcado con ^{177}Lu se purificó por cromatografía en gel con una columna NAP-5 (Amersham, eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 72,2%.
 Pureza radioquímica: 94,9% (SDS-PAGE).
 Actividad específica: 18,3 MBq/nmol.
 Inmunorreactividad: 73,4%.

Distribución en los órganos y excreción de ^{111}In -MX-DTPA-L19-SIP después de una única inyección i.v. en ratones sin pelo con tumores (comparación)

10 **[0158]** Los péptidos marcados de la invención se inyectaron por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 37 kBq en animales con F9 (teratocarcinoma) (peso corporal de aproximadamente 25 g). La concentración de radioactividad en diversos órganos y la radioactividad en las excreciones se midió mediante un contador γ a diversos tiempos después de la administración de la sustancia.

15 **[0159]** La biodistribución de ^{111}In -MX-DTPA-L19-SIP en ratones sin pelo con F9 (teratocarcinoma) (media \pm SD), n = 3) se muestra en la tabla 6.

Distribución en los órganos y excreción de ^{99m}Tc -L19-SIP después de una única inyección i.v. en ratones sin pelo con tumores (comparación)

20 **[0160]** Los péptidos marcados se inyectaron por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 56 kBq en animales con F9 (teratocarcinoma) (peso corporal de aproximadamente 25 g). La concentración de radioactividad en diversos órganos y la radioactividad en las excreciones se midió mediante un contador γ a diversos tiempos después de la administración de la sustancia. Además se calculó el cociente entre el tumor y la sangre a diversos tiempos basada en la concentración del péptido en el tumor y en la sangre.

[0161] La biodistribución de ^{99m}Tc -L19-SIP en ratones sin pelo con F9 (teratocarcinoma) (media \pm SD, n = 3) se muestra en la tabla 7.

30 **[0162]** El cociente de ^{99m}Tc -L19-SIP entre el tumor y la sangre en ratones sin pelo con F9 (teratocarcinoma) (media \pm SD, n = 3) se muestra en la tabla 8.

[0163] Los péptidos radiomarcados demostraron tener propiedades favorables en experimentos con animales. Por ejemplo, ^{99m}Tc -L19-SIP e ^{111}In -MX-DTPA- ϵ -HN(Lys)-L19-SIP mostraron una elevada acumulación en el tumor del 17,2% (^{99m}Tc) o el 12,9% (^{111}In) de la dosis inyectada por gramo (ID/g) 1 h después de la inyección (i.p.). A las 24 h p.i. se observó una retención significativa en el tumor del 9,4% (^{99m}Tc) o el 13,0% (^{111}In) ID/g. Por lo tanto, la absorción por el tumor es significativamente mayor en comparación con otros fragmentos de anticuerpos conocidos marcados con ^{99m}Tc o ^{111}In (por ejemplo, Kobayashi y col., J. Nuc. Med., vol. 41(4), págs. 755-762, 2000; Verhaar y col., J. Nuc. Med., vol. 37(5), págs. 868-872, 1996). El aclaramiento sanguíneo de los compuestos condujo a unos cocientes tumor/sangre a las 24 h p.i. de 13:1 y 6:1, respectivamente.

[0164] Más notablemente, ^{111}In -MX-DTPA- ϵ -HN(Lys)-L19-SIP mostró una absorción y retención renal significativamente inferior (22,5% ID/g) a las 24 h p.i. que otro fragmento de anticuerpo recombinante marcado con ^{111}In de alta retención (120% ID/g) descrito, por ejemplo, por Kobayashi y col., La retención renal es un problema muy común y dificulta habitualmente el uso de compuestos marcados con lantánidos en radioterapia.

[0165] Los resultados experimentales demuestran el excelente potencial de los radioinmunoconjugados descritos en este documento para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, preferentemente administrados al paciente por vía parenteral.

50 Discusión

[0166] La observación de que fármacos citotóxicos contra el cáncer se localizan más eficientemente en los tejidos normales que en los tumores (37 Bosslet y col., 1998) impulsó una ola de estudios para investigar la posibilidad de una administración selectiva de fármacos a los tumores. Sin embargo, el reconocimiento eficaz de los tumores como diana presenta dos requisitos principales: 1) una diana en el tumor que sea específica, abundante, estable y fácilmente disponible para moléculas de ligando procedentes de la corriente sanguínea y 2) una molécula de ligando con propiedades farmacocinéticas adecuadas que pueda difundirse fácilmente desde la corriente sanguínea al tumor y tenga una gran afinidad por la diana para asegurar su acumulación eficiente y selectiva en el

tumor.

[0167] Debido a sus características distintivas, el microentorno tumoral es una posible diana pantumoral. De hecho, la progresión del tumor induce (y subsiguientemente necesita) modificaciones significativas de los componentes del microentorno tumoral, en particular de aquellos de la matriz extracelular (MEC). Las moléculas que componen la MEC de los tumores sólidos difieren cuantitativa y cualitativamente de las de la MEC normal. Además, muchos de estos componentes de la MEC tumoral están presentes en todos los tumores sólidos y contribuyen a las propiedades y funciones generales como la invasión celular (tanto de células normales en los tejidos tumorales como de células cancerosas en los tejidos normales) y la angiogénesis. De las numerosas moléculas que componen la MEC tumoral modificada, los presentes inventores han centrado su atención en una isoforma de FN que contiene el dominio ED-B (B-FN).

[0168] La proteína B-FN se expresa ampliamente en la MEC de todos los tumores sólidos investigados hasta el momento y está constantemente asociada con procesos angiogénicos (22 Castellani y col., 1994), pero, por lo demás, es indetectable en tejidos adultos normales (17 Carnemolla y col., 1989). La administración dirigida de agentes terapéuticos a la MEC subendotelial supera los problemas asociados con la hipertensión intersticial de los tumores sólidos (38 Jain y col., 1988; 39 Jain, 1997; 40 Jain, R. K., 1999).

[0169] L19 (13 Pini y col., 1998; 25 Viti, Canc. Res., 23 Tarli y col., 1999), un anticuerpo scFv con una gran afinidad ($K_d = 5,4 \times 10^{-11}$ M) por el dominio ED-B de FN, se acumula selectiva y eficientemente *in vivo* alrededor de la neovasculatura tumoral y es capaz de transportar y concentrar selectivamente en la masa del tumor cualquiera de una serie de moléculas terapéuticas con las que esté conjugado (28 Birchler y col., 1999; 29 Nilsson y col., 2001; 30 Halin y col., 2002; Carnemolla y col., 2002). La capacidad de L19 de dirigirse selectivamente a los tumores se ha demostrado también en pacientes mediante técnicas escintográficas.

[0170] La presente memoria descriptiva expone el marcaje de una inmunoproteína pequeña (SIP) con radioisótopos, el uso de la SIP radiomarcada y el rendimiento en el reconocimiento de la vasculatura tumoral como diana y la farmacocinética de tres formatos diferentes del anticuerpo L19 humano: scFv (no es parte de la invención), la miniinmunoglobulina/inmunoproteína pequeña y la IgG1 humana completa (no es parte de la invención).

[0171] La molécula SIP se obtuvo por fusión de scFv(L19) con el dominio ϵ CH4 de la isoforma secretora S₂ de la IgE humana. El dominio ϵ CH4 permite la dimerización de las moléculas de IgE y la isoforma S₂ contiene una cisteína en el extremo COOH que estabiliza covalentemente el dímero a través de un puente disulfuro intercatenario (35 Batista y col., 1996). Los sitios de unión de IgE con FC ϵ RI residen en el dominio CH3 (41 Turner y Kinet, 1999; 42 Vangelista y col., 1999; 43 German y col., 2000), de modo que scFv fusionado con el dominio ϵ CH4 según realizaciones de la presente invención no activa ninguna señalización que dé lugar a reacciones de hipersensibilidad.

[0172] Se ha estudiado el rendimiento de estos tres formatos en dos modelos diferentes de tumor en ratones: teratocarcinoma F9 murino y melanoma SK-MEL-28 humano. El primero es un tumor de crecimiento rápido que, una vez implantado, mata al animal en aproximadamente dos semanas. El tumor SK-MEL-28, por otro lado, presenta una curva de crecimiento bifásico con una fase temprana de crecimiento rápido, seguida de una segunda fase más lenta. Se ha demostrado previamente que la cantidad de ED-B en el teratocarcinoma F9 se mantiene estable durante el crecimiento del tumor (23 Tarli y col., 1999); en comparación, ED-B se acumula en el melanoma SK-MEL-28 proporcionalmente a la capacidad de crecimiento del tumor (23 Tarli y col., 1999), en que ED-B se encuentra abundantemente en la primera fase y en menor cantidad en la segunda. El uso del tumor de melanoma SK-MEL-28 permitió estudios de biodistribución a largo plazo sin grandes variaciones de la masa tumoral (figura 2) que pudieran dar lugar a una malinterpretación de los resultados.

[0173] Los estudios comparativos de los tres formatos del anticuerpo L19 en cuanto a la estabilidad *in vivo* demostraron que L19-SIP y L19-IgG1 (no es parte de la invención) mantuvieron durante la duración del experimento (144 h) la misma inmunorreactividad y peso molecular en el plasma que antes de la inyección. Por el contrario, scFv(L19) (no es parte de la invención) perdió su inmunorreactividad en el plasma y generó agregados demasiado grandes para penetrar en la columna cromatográfica de filtración en gel. Probablemente, esta agregación de scFv es responsable del cociente entre el % ID/g del tumor y el pulmón, dado que los agregados pudieron acumularse en la microvasculatura del pulmón (tabla 3). Para los tres formatos, el aclaramiento sanguíneo tiene lugar principalmente por medio del riñón y muestra una curva bifásica con una fase α y una fase β , expuesta en la tabla 4, que es inversamente proporcional al tamaño molecular.

[0174] La acumulación de los diferentes formatos del anticuerpo en los tumores estudiados fue una consecuencia de la velocidad de aclaramiento y de la estabilidad *in vivo* de las moléculas. Para scFv, el máximo porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% ID/g) se observó 3 h después de la inyección del anticuerpo radiomarcado y después disminuyó rápidamente. Para SIP, el % ID/g en los tumores fue de dos a cinco veces mayor que el de scFv y alcanzó el máximo 4-6 h después de la inyección. Este patrón se observó tanto en los tumores F9 como SK-MEL-28. Por el contrario, la acumulación de IgG1 en los tumores aumentó constantemente durante los experimentos. Sin embargo, debido a su lento aclaramiento, el cociente tumor/sangre del % ID/g después de 144 h fue solamente de aproximadamente 3, en comparación con un cociente de 10 para scFv y de 70 para SIP después del mismo período de tiempo (figura 4).

[0175] Las mismas propiedades distintivas de estabilidad *in vivo*, aclaramiento y rendimiento en el reconocimiento del tumor como diana mostradas por los tres formatos del anticuerpo estudiados en este documento pueden explotarse para distintos fines de diagnóstico y/o terapéuticos, en función de las necesidades clínicas y de la enfermedad. Por ejemplo, para la inmunoescintigrafía de diagnóstico *in vivo* se necesitan anticuerpos radiomarcados que muestren altos cocientes tumor/órgano y tumor/sangre poco después de la inyección, principalmente debido a la corta semivida de los isótopos usados en tales análisis.

[0176] Al usar anticuerpos como vehículos para agentes terapéuticos son posibles diferentes estrategias: la administración de sustancias que manifiestan sus efectos terapéuticos después de alcanzar sus dianas (por ejemplo, fotosensibilizadores activados solamente en las dianas), para las que la cantidad absoluta administrada al tumor es relevante; la administración de sustancias que ejercen sus efectos terapéuticos y tóxicos incluso antes de alcanzar la diana (por ejemplo, el emisor $\beta^{90}\text{Y}$) para el que es necesario prestar especial atención al cociente del área bajo las curvas de acumulación en el tumor y en la sangre en función del tiempo con el fin de minimizar la toxicidad sistémica y maximizar el efecto terapéutico contra el tumor.

[0177] L19-SIP, por ejemplo, parece ofrecer el mejor compromiso de estabilidad molecular, velocidad de aclaramiento y acumulación en el tumor. Se han descrito proteínas de fusión similares compuestas de fragmentos de anticuerpo scFv unidos a un dominio de dimerización (44 Hu y col., 1996; 33 Li y col., 1997), pero en los dos casos se usó $\gamma 1\text{CH3}$ humano como dominio de dimerización. El uso del dominio humano $\epsilon_{\text{S2}}\text{CH4}$ proporciona una manera fácil de obtener una estabilización covalente del dímero. Además, el puente disulfuro formado por los restos de cisteína C-terminales puede reducirse fácilmente en condiciones lo suficientemente suaves como para conservar la estructura total de la molécula, lo que proporciona un grupo reactivo fácilmente accesible para el radiomarcado o la conjugación química. Esta característica parece particularmente prometedora desde el punto de vista del potencial clínico.

[0178] L19-IgG1 se acumula abundantemente en los tumores y, aunque esta acumulación queda contrarrestada por una lenta velocidad de aclaramiento sanguíneo, puede usarse el procedimiento en tres etapas para eliminar los anticuerpos circulantes con el fin de permitir su uso no solo para fines terapéuticos, sino también para inmunoescintigrafía de diagnóstico (45 Magnani y col., 2000).

Referencias

- [0179]**
1. Shawler y col. J.Immunol., 135: 1530-1535, 1985
 2. Miller y col. Blood, 62: 988-995, 1983.
 3. Hakimi y col. J.Immunol., 147: 1352-1359,1991.
 4. Stephens y col. Immunology, 85: 668-674, 1995.
 5. Riechmann y col. Nature, 332: 323-327, 1988.
 6. Junghans y col. Cancer Res., 50: 1495-1502, 1990.
 7. McCafferty y col. Nature, 348: 552-554, 1990.
 8. Lowman y col. Biochemistry, 30: 10832-10838, 1991.
 9. Nilsson y col. Advanced Drug Delivery Reviews, 93: 165-196, 2000.
 10. Winter y col. Annu.Rev.Immunol., 12: 433-455, 1994.
 11. Reichert. Nature Biotech., 19: 819-822, 2001.
 12. Huls y col. Nature Biotech., 17: 276-281, 1999,
 13. Pini y col. J Biol Chem, 273: 21769-21776, 1998.
 14. Neri y Zardi. Advanced Drug Delivery Reviews, 31: 43-52, 1998.
 15. Bissel y Radisky. Nature Reviews - Cancer., 1: 46-54, 2001

5
10
15
20
25
30

16. Balza y col. FEBS Lett., 228: 42-44, 1988
 17. Carnemolla y col. J. Cell. Biol., 108: 1139-1148, 1989
 18. Borsi y col. FEBS Lett., 261: 175-178, 1990
 19. Borsi y col. J. Biol.Chem., 270: 6243-6245, 1995.
 20. Zardi y col. EMBO J., 6: 2337-2342, 1987.
 21. French-Constant y col. J.Cell Biol., 109: 903-914, 1989.
 22. Castellani y col. Int J Cancer, 59: 612-618, 1994
 23. Tarli y col. Blood, 94:192-198, 1999.
 24. Carnemolla y col. Int J Cancer, 68: 397-405, 1996
 25. Viti y col. Cancer Res, 59: 347-353, 1999.
 26. Neri y col. Nature Biotechnol, 15: 1271-1275, 1997.
 27. Demartis y col. Eur J Nucl Med, 28: 4534-4539, 2001.
 28. Birchler y col. Nat Biotechnol, 17: 984-988, 1999
 29. Nilsson y col. Cancer Res., 61: 711-716, 2001.
 30. Halin y col. Nature Biotechnol. In the press, 2002.
 31. Carnemolla y col. Blood , 99 : , 2002
 32. Wu y col. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 97: 8495-8500, 2000.
 33. Li y col. Protein Engineering, 10: 731-736, 1997
 34. Pini y col. J. Immunol. Methods, 206: 171-183, 1997.
 35. Batista y col. J. Exp. Med., 184: 2197-205, 1996.
 36. Riske y col. J.Biol. Chem., 266: 11245-11251, 1991.
 37. Bosslet y col. Cancer Res., 58:1195-1201, 1998.
 38. Jain y Baxter. Cancer Res., 48: 7022-7032, 1988.
 39. Jain. Vascular and interstitial physiology of tumors. Role in cancer detection and treatment. En: R. Bicknell, C. E. Lewis y N. Ferrara (eds). Tumour Angiogenesis, págs. 45-59. Nueva York: Oxford University Press, 1997.
 40. Jain. Annu. Rev. Biomed. Eng., 1: 241-263, 1999.
 41. Turner y Kinet. Nature, 402 Suppl., B24-B30, 1999.
 42. Vangelista y col. Jour. Clin. Invest., 103:1571-1578, 1999.
 43. Garman y col. Nature, 406: 259-266, 2000.
 44. Hu y col. Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996.
 45. Magnani y col. Br. J. Cancer, 82: 616-620, 2000.

35 Tabla 1. Inmunorreactividad (I*) y recuperación de radioactividad (R) de Superdex 200 de los anticuerpos radiomarcados a distintos tiempos después de la inyección i.v.

Tiempo (h)	3		6		24		48		72		144	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
L19(scFv)	36	54	32	58	27	nd	14	nd	9	nd	4	nd
L19-SIP	100	100	100	96	100	94	95	96	100	nd	95	nd
L19-IgG1	100	100	100	100	95	100	100	100	100	100	95	100

- La inmunorreactividad (%) y la recuperación de radioactividad (%) de Superdex 200 se determinaron en plasma según se describe en la sección de materiales y procedimientos.

-* Para normalizar, los resultados del ensayo de inmunorreactividad se refieren a los valores de porcentaje de la inmunorreactividad antes de la inyección i.v.

- nd: no determinado

Tabla 2a. Experimentos de biodistribución de los fragmentos de los anticuerpos L19 y D1.3 radiomarcados en ratones con tumores SK-MEL-28

L19(scFv)	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Tumor	2,47 ± 0,65	2,01 ± 0,72	1,62 ± 0,43	0,95 ± 0,14	0,68 ± 0,04	0,32 ± 0,14
Sangre	1,45 ± 0,58	0,54 ± 0,12	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Hígado	0,48 ± 0,20	0,18 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Bazo	0,67 ± 0,28	0,27 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Riñón	4,36 ± 0,32	1,67 ± 0,08	0,16 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,00
Intestino	0,77 ± 0,21	0,57 ± 0,05	0,24 ± 0,06	0,17 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,09 ± 0,01
Corazón	0,77 ± 0,20	0,31 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00

Pulmón	2,86 ± 0,34	1,50 ± 0,67	1,07 ± 0,42	0,73 ± 0,39	0,55 ± 0,11	0,51 ± 0,22
--------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

D1.3(scFv)						
	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Tumor	1,03 ± 0,74	0,87 ± 0,42	0,15 ± 0,10	0,07 ± 0,02	nd	nd
Sangre	1,52 ± 0,86	0,81 ± 0,13	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	nd	nd
Hígado	1,19 ± 0,65	0,66 ± 0,26	0,14 ± 0,04	0,03 ± 0,08	nd	nd
Bazo	1,05 ± 0,88	0,42 ± 0,33	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	nd	nd
Riñón	3,01 ± 2,48	1,83 ± 0,76	0,48 ± 0,01	0,18 ± 0,05	nd	nd
Intestino	0,56 ± 0,54	0,56 ± 0,13	0,17 ± 0,03	0,02 ± 0,01	nd	nd
Corazón	0,86 ± 0,54	0,55 ± 0,84	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	nd	nd
Pulmón	1,28 ± 0,65	1,06 ± 0,88	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	nd	nd

Los resultados se expresan como porcentaje de la dosis de anticuerpo inyectada por gramo de tejido (% ID/g) ± SD
nd: no determinado

Tabla 2b. Experimentos de biodistribución de L19-SIP y D1.3-SIP radiomarcados en ratones con tumores SK-MEL-28

L19-SIP						
	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Tumor	5,23 ± 0,65	6,14 ± 2,23	4,20 ± 2,47	2,57 ± 0,31	2,33 ± 0,90	1,49 ± 0,65
Sangre	9,82 ± 0,68	5,03 ± 0,52	1,39 ± 0,06	0,29 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Hígado	2,65 ± 0,14	1,74 ± 0,31	0,50 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Bazo	3,76 ± 0,36	2,43 ± 0,24	0,71 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,18
Riñón	7,33 ± 0,91	3,87 ± 0,21	1,09 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Intestino	1,45 ± 0,24	1,44 ± 0,29	1,06 ± 0,43	0,56 ± 0,08	0,40 ± 0,08	0,18 ± 0,00
Corazón	4,16 ± 0,20	2,15 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Pulmón	7,72 ± 0,60	5,41 ± 0,55	1,81 ± 0,40	0,59 ± 0,29	0,19 ± 0,03	0,05 ± 0,01

5

D1.3-SIP						
	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Tumor	3,80 ± 0,30	1,65 ± 0,12	0,70 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,03
Sangre	10,40 ± 0,81	4,45 ± 0,14	1,21 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,02
Hígado	4,05 ± 0,98	2,73 ± 0,33	1,43 ± 0,07	0,51 ± 0,21	0,15 ± 0,08	0,02 ± 0,01
Bazo	3,31 ± 0,66	1,76 ± 0,50	0,82 ± 0,12	0,46 ± 0,20	0,15 ± 0,05	0,04 ± 0,02
Riñón	8,41 ± 0,49	4,64 ± 0,06	1,47 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,06 ± 0,01
Intestino	2,03 ± 0,55	1,06 ± 0,20	1,02 ± 0,06	0,14 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,04
Corazón	3,28 ± 0,20	1,81 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Pulmón	6,16 ± 0,28	4,52 ± 0,07	1,16 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01

Los resultados se expresan como porcentaje de la dosis de anticuerpo inyectada por gramo de tejido (% ID/g) ± SD
nd: no determinado

Tabla 2b. Experimentos de biodistribución de L19-IgG1 y hlgG1κ radiomarcados en ratones con tumores SK-MEL-28 L19-IgG1

L19-IgG1						
	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Tumor	4,46 ± 0,08	5,39 ± 1,01	6,70 ± 2,10	7,80 ± 2,51	8,90 ± 2,52	11,22 ± 3,19
Sangre	6,04 ± 0,81	12,02 ± 1,65	8,31 ± 1,77	5,12 ± 1,42	5,02 ± 3,18	4,87 ± 0,26
Hígado	6,03 ± 0,37	6,77 ± 0,53	2,41 ± 0,35	1,45 ± 0,41	1,26 ± 0,71	1,09 ± 0,16
Bazo	6,63 ± 1,34	6,37 ± 1,37	2,51 ± 0,47	2,01 ± 0,32	1,80 ± 1,02	1,51 ± 0,29
Riñón	6,47 ± 0,39	5,12 ± 0,47	3,07 ± 0,35	1,73 ± 0,63	1,54 ± 1,14	1,12 ± 0,44
Intestino	1,60 ± 0,39	1,35 ± 0,65	1,43 ± 0,19	1,13 ± 0,32	1,13 ± 0,98	0,97 ± 0,47
Corazón	5,63 ± 0,67	4,77 ± 0,52	2,87 ± 0,45	1,48 ± 0,51	1,32 ± 1,09	0,92 ± 0,37
Pulmón	6,55 ± 0,65	5,15 ± 0,62	4,16 ± 0,66	2,28 ± 0,80	1,98 ± 1,60	1,42 ± 0,45

hlgG1κ						
	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Tumor	nd	3,28 ± 0,38	4,00 ± 0,22	2,78 ± 0,20	nd	2,32 ± 0,26

ES 2 361 743 T3

Sangre	nd	10,12 ± 0,35	7,87 ± 0,25	6,24 ± 0,34	nd	5,41 ± 0,51
Hígado	nd	4,02 ± 0,09	2,06 ± 0,10	1,90 ± 0,24	nd	1,28 ± 0,03
Bazo	nd	4,47 ± 0,28	1,82 ± 0,01	1,42 ± 0,19	nd	1,24 ± 0,03
Riñón	nd	5,40 ± 0,19	2,56 ± 0,06	2,08 ± 0,22	nd	1,30 ± 0,15
Intestino	nd	0,72 ± 0,07	0,46 ± 0,05	0,36 ± 0,03	nd	0,31 ± 0,01
Corazón	nd	3,80 ± 0,15	2,52 ± 0,21	0,99 ± 0,18	nd	1,48 ± 0,13
Pulmón	nd	4,82 ± 0,92	3,64 ± 0,08	1,75 ± 0,32	nd	1,09 ± 0,13

Los resultados se expresan como porcentaje de la dosis de anticuerpo inyectada por gramo de tejido (% ID/g) ± SD
 nd: no determinado

Tabla 3. Cocientes tumor/órgano de los % ID/g para los formatos del anticuerpo L19 radiomarcados en ratones con tumores SK-MEL-28

Tiempo (h)	L19(scFv)				L19-SiP				L19-IgG1			
	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144
Tumor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sangre	1,7	3,7	16,2	23,7	22,7	10,7	0,5	1,2	3,0	8,9	29,1	74,5
Hígado	5,1	11,1	40,5	47,5	34,0	16,0	2,0	3,5	8,4	13,5	23,3	29,8
Bazo	3,7	7,4	23,1	31,6	34,0	16,0	1,4	2,5	5,9	10,0	17,9	8,8
Riñón	0,6	1,2	10,1	15,8	17,0	10,7	0,7	1,6	3,8	8,6	16,6	29,8
Intestino	3,2	3,5	6,7	5,6	5,7	3,6	3,6	4,3	4,0	4,6	5,8	8,3
Corazón	3,2	6,5	23,1	47,5	34,0	16,0	1,3	2,9	8,1	20,0	38,8	74,5
Pulmón	0,9	1,3	1,5	1,3	1,2	0,6	0,7	1,1	2,3	4,3	12,3	29,8

Tabla 4. Parámetros cinéticos del aclaramiento sanguíneo de los tres formatos del anticuerpo L19.

	α		β	
	(%) ^{a)}	t _{1/2} (h)	(%) ^{a)}	t _{1/2} (h)
L19(scFv)	96,7	0,53	3,3	8,00
L19-SIP	83,7	1,06	16,3	10,66
L19-IgG1	76,9	1,48	23,1	106,7

a) Magnitud relativa de los dos componentes de la semivida

Tabla 5. Experimentos de biodistribución de L19(scFv) y L19-SIP radiomarcados en ratones con tumores F9

L19(scFv)	3 h	6 h	24 h	48 h
Tumor	10,46 ± 1,75	8,15 ± 2,63	3,18 ± 0,83	2,83 ± 0,71
Sangre	2,05 ± 0,38	1,88 ± 1,14	0,17 ± 0,01	0,06 ± 0,02
Hígado	1,62 ± 1,67	0,73 ± 0,51	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Bazo	1,53 ± 0,36	0,90 ± 0,54	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Riñón	12,70 ± 0,73	4,37 ± 0,98	0,24 ± 0,03	0,18 ± 0,08
Intestino	0,68 ± 0,15	0,95 ± 0,23	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,06
Corazón	1,35 ± 0,21	0,81 ± 0,38	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Pulmón	2,88 ± 0,29	2,06 ± 0,69	0,38 ± 0,60	0,33 ± 0,05
L19-SIP	3 h	6 h	24 h	48 h
Tumor	17,46 ± 1,93	16,65 ± 2,59	15,32 ± 2,17	12,00 ± 1,91
Sangre	13,51 ± 0,57	9,62 ± 1,18	1,73 ± 0,02	1,14 ± 0,20
Hígado	2,81 ± 0,37	2,39 ± 0,13	0,54 ± 0,14	0,32 ± 0,00
Bazo	3,42 ± 0,26	2,66 ± 0,27	0,61 ± 0,09	0,37 ± 0,01
Riñón	9,18 ± 0,76	5,85 ± 0,50	1,16 ± 0,05	0,76 ± 0,06
Intestino	0,95 ± 0,03	1,36 ± 0,21	0,83 ± 0,11	1,04 ± 0,14
Corazón	4,64 ± 0,24	3,67 ± 0,46	0,67 ± 0,06	0,46 ± 0,07
Pulmón	5,61 ± 0,01	5,93 ± 0,57	1,66 ± 0,19	0,91 ± 0,08

Los resultados se expresan como porcentaje de la dosis de anticuerpo inyectada por gramo de tejido (% ID/g) ± SD
nd: no determinado

5

Tabla 6

	% de dosis / g de tejido		
	1 h p.i.	3 h p.i.	24 h p.i.
Bazo	5,05 ± 1,04	4,27 ± 0,27	4,86 ± 1,77
Hígado	10,80 ± 1,52	10,57 ± 1,44	10,68 ± 1,51
Riñón	14,30 ± 1,45	16,71 ± 2,42	2,48 ± 6,79
Pulmón	9,94 ± 1,72	6,15 ± 0,80	3,03 ± 0,95
Estómago sin contenido	1,10 ± 0,13	1,62 ± 0,19	1,66 ± 0,24
Intestino con contenido	1,67 ± 0,14	2,65 ± 0,30	2,64 ± 1,40
Tumor	12,93 ± 2,76	10,18 ± 2,28	12,96 ± 3,13
Sangre	17,10 ± 1,49	9,08 ± 0,96	1,98 ± 0,47

Tabla 7

	% de dosis / g de tejido		
	1 h p.i.	3 h p.i.	24 h p.i.
Bazo	6,92 ± 1,3	5,37 ± 0,23	2,06 ± 0,48
Hígado	14,65 ± 0,81	12,43 ± 0,37	4,62 ± 0,52
Riñón	22,07 ± 1,87	15,99 ± 1,10	5,92 ± 1,18
Pulmón	10,06 ± 1,67	5,33 ± 0,49	1,32 ± 0,25
Estómago sin contenido	2,18 ± 0,39	2,12 ± 0,09	1,15 ± 0,08
Intestino con contenido	3,03 ± 0,25	3,62 ± 0,58	1,20 ± 0,12
Tumor	17,20 ± 7,49	18,79 ± 5,35	9,42 ± 3,84
Sangre	16,53 ± 2,04	7,42 ± 0,21	0,73 ± 0,14

Tabla 8

	1 h p.i.	3 h p.i.	24 h p.i.
Cociente tumor/sangre	1,01 ± 0,33	2,54 ± 0,74	12,81 ± 4,03

Lista de secuencias

- 5 **[0180]**
 <110> Philogen S.P.A.
 Schering AG
 Borsi, Laura
 Carnemolla, Barbara
- 10 Balza, Enrica
 Castellani, Patrizia,
 Zardi, Luciano
 Friebe, Matthias
 Hilger, Christoph-Stephan
- 15 <120> Reconocimiento selectivo de la vasculatura tumoral como diana mediante moléculas de anticuerpos radiomarcadas
 <130> SMW/FP6354641
 <140> EP 04764695.5
 <141> 01-09-2004
- 20 <150> EP 03255633.4
 <151> 10-09-2003
 <150> US 60/501.881
 <151> 10-09-2003
 <160> 13
- 25 <170> PatentIn, versión 3.1
 <210> 1
 <211> 5
 <212> Proteína
 <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 1

Ser Phe Ser Met Ser
 1 5

- <210> 2
- <211> 17
- <212> Proteína
- 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

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

- <210> 3
- <211> 7
- 40 <212> Proteína
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

- <210> 4
- 45 <211> 12
 <212> Proteína

<213> *Homo sapiens*
<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 5
5 <211> 7
<212> Proteína
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

10 <210> 6
<211> 9
<212> Proteína
<213> *Homo sapiens*
<400> 6

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
1 5 10

15 <210> 7
<211> 4
<212> Proteína
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Péptido enlazante
<400> 7

gly gly ser gly
1

<210> 8
25 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
30 <400> 8
gtgtgcactc ggaggtgcag ctgtggagt ctggg 35
<210> 9
<211> 36
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 9
gcctcggat ttgattcca ccttggtccc ttggcc 36
40 <210> 10
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
45 <223> Cebador

<400> 10
 ctctgcact cgcaggtgca gctgcaggag tca 33
 <210> 11
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 11
 10 ctctccgac cgttgatct cgcgcttgg 30
 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 12
 tgggtgcac tcggaaattg tggtagcga gtc 33
 <210> 13
 20 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 25 <400> 13
 ctctcgtacg ttgattcc accttggcc 30

REIVINDICACIONES

1. Un miembro de unión específica que se une a ED-B humano, en el que el miembro de unión específica está marcado con un isótopo y comprende un sitio de unión a un antígeno que comprende un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL, en que el isótopo es ^{131}I y en que el dominio de anticuerpo VH comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH, en que la CDR3 de VH es la CDR3 de VH de L19 de SEQ ID NO. 3, la CDR1 de VH es la CDR1 de VH de L19 de SEQ ID NO. 1 y la CDR2 de VH es la CDR2 de VH de L19 de SEQ ID NO. 2; y en que el dominio de anticuerpo VL comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL, en que la CDR3 de VL es la CDR3 de VL de L19 de SEQ ID NO. 6, la CDR1 de VL es la CDR1 de VL de L19 de SEQ ID NO. 4 y la CDR2 de VL es la CDR2 de VL de L19 de SEQ ID NO. 5; en que el miembro de unión específica comprende una miniinmunoglobulina que comprende dichos dominio de anticuerpo VH y dominio de anticuerpo VL fusionados a ϵ_{S2} -CH4 y dimerizados.
2. Un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1, en que el miembro de unión específica compite por la unión a ED-B con un dominio de unión a ED-B de un anticuerpo que comprende el dominio VH de L19 y el dominio VL de L19.
3. Un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende el dominio VH de L19.
4. Un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende el dominio VL de L19.
5. Un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 4, en que el dominio de anticuerpo VH y el dominio de anticuerpo VL se encuentran en una molécula de anticuerpo scFv fusionada con ϵ_{S2} -CH4.
6. Un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 5, en que la molécula de anticuerpo scFv está fusionada a ϵ_{S2} -CH4 por medio de un péptido enlazante.
7. Un miembro de unión específica de acuerdo con la reivindicación 6, en que el péptido enlazante tiene la secuencia de aminoácidos GGSG (SEQ ID NO. 7).
8. Un procedimiento para la producción de un miembro de unión específica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que el procedimiento comprende el marcaje de un miembro de unión específica con el isótopo ^{131}I .
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que el marcaje comprende la oxidación de un haluro en presencia del miembro de unión específica, en que el haluro es ^{131}I .
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en que el marcaje comprende la conjugación de un portador de halógeno bifuncional activado que contiene un radioisótopo con un resto de lisina o cisteína o con el extremo N del miembro de unión específica, en que el radioisótopo es ^{131}I .
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en que el procedimiento comprende la expresión del ácido nucleico que codifica el miembro de unión específica antes del marcaje.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende el cultivo de las células hospedadoras en las condiciones para la producción del miembro de unión específica.
13. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 que comprende además el aislamiento y/o purificación del miembro de unión específica.
14. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 que comprende además la formulación del miembro de unión específica en una composición que incluye al menos un componente adicional.
15. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 que comprende además la unión del miembro de unión específica a ED-B o a un fragmento de ED-B *in vitro*.

16. Un procedimiento que comprende la unión a ED-B o a un fragmento de ED-B de un miembro de unión específica que se une a ED-B de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que dicha unión tiene lugar *in vitro*.
- 5
17. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 15 ó 16 que comprende la determinación de la cantidad de unión a ED-B o a un fragmento de ED-B del miembro de unión específica.
18. Una composición que comprende un miembro de unión específica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para usar en un procedimiento para el tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.
- 10
19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 para usar en un procedimiento para el tratamiento de una lesión de angiogénesis patológica.
- 15
20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 para usar en un procedimiento para el tratamiento de un tumor.
21. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para usar en un procedimiento de diagnóstico.
- 20
22. Uso de un miembro de unión específica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una lesión de angiogénesis patológica.
- 25
23. Uso de un miembro de unión específica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.
24. Uso de un miembro de unión específica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un reactivo de diagnóstico.
- 30

Figura 1A

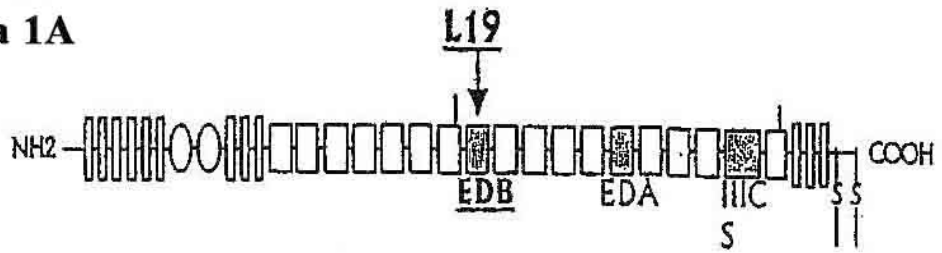


Figura 1B

L19scFv/pDN322

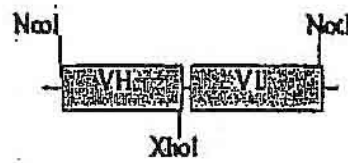


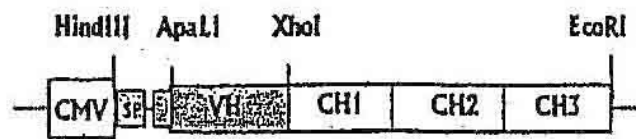
Figura 1C

L19SIP/pCDNA3

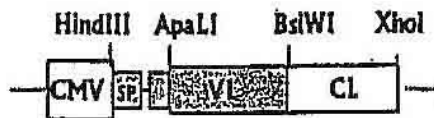


Figura 1D

L19HIgG1/pcDNA3



L19kL/pCMV2Δ



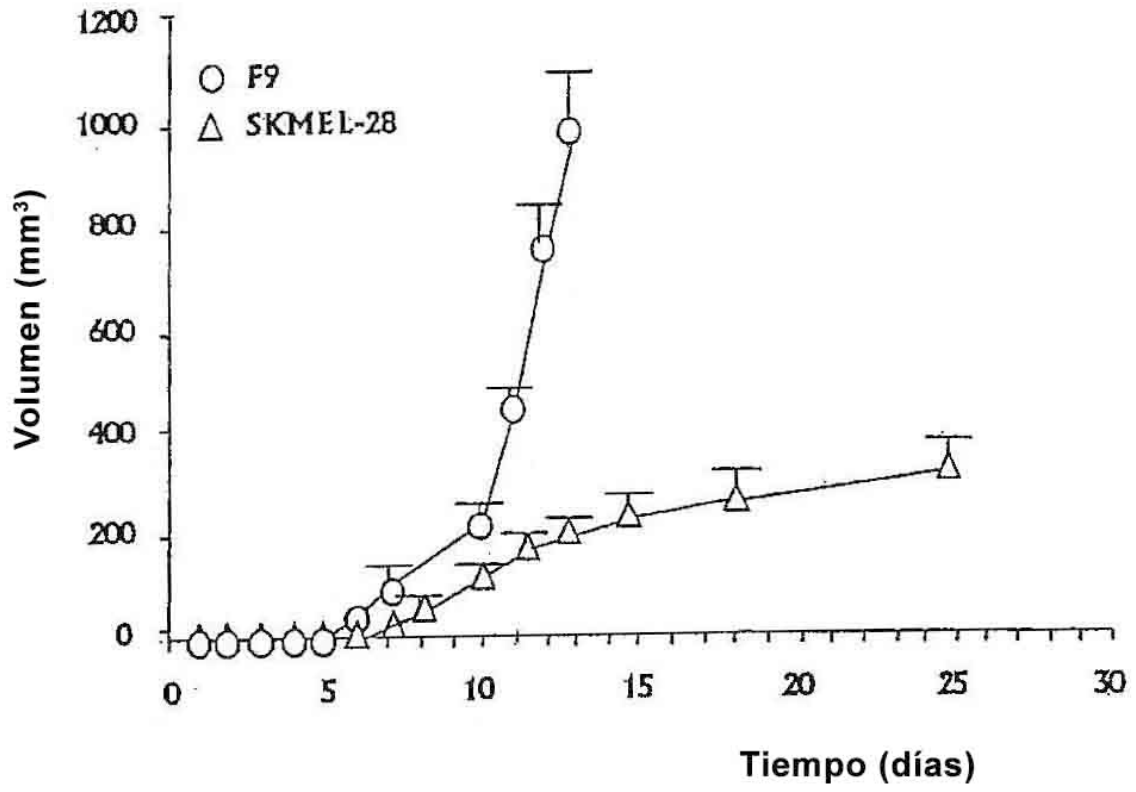


Figura 2

Figura 3A

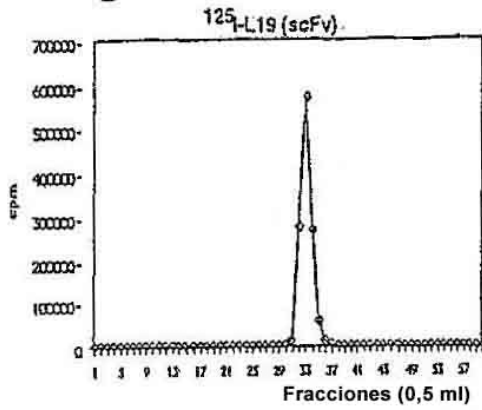


Figura 3D

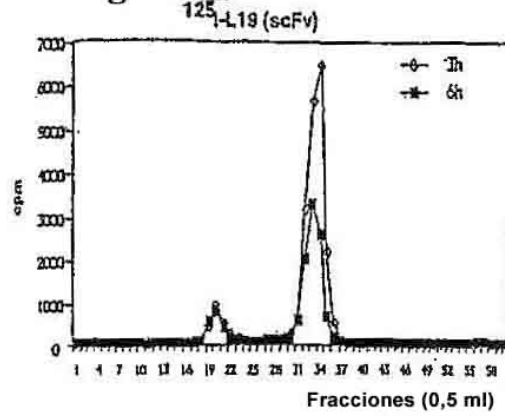


Figura 3B

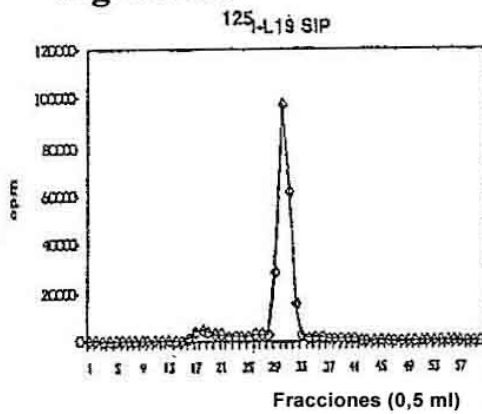


Figura 3E

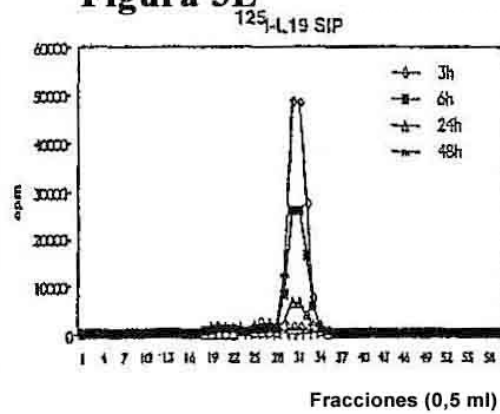


Figura 3C

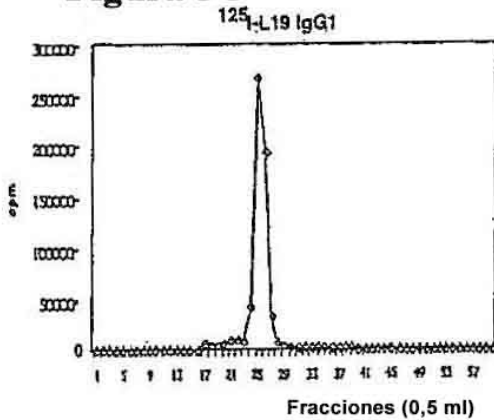


Figura 3F ^{125}I -L19 IgG1

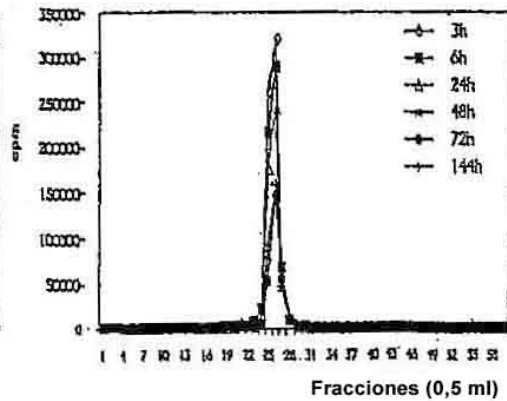


Figura 4A

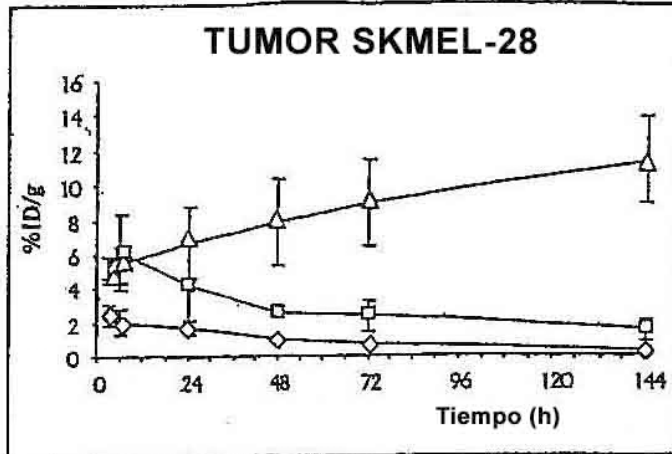


Figura 4B

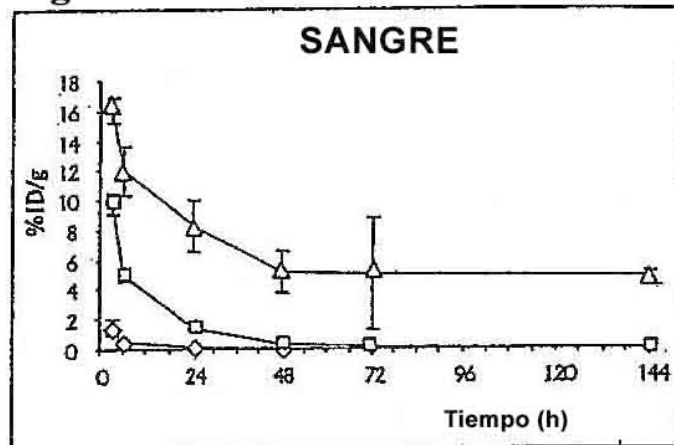


Figura 4C

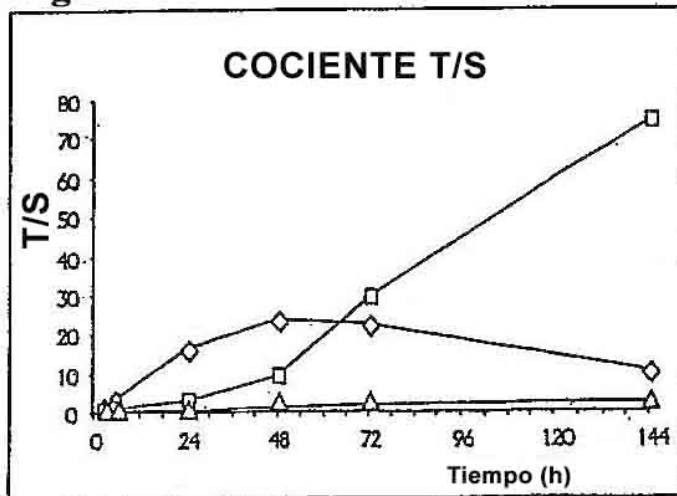


Figura 5A

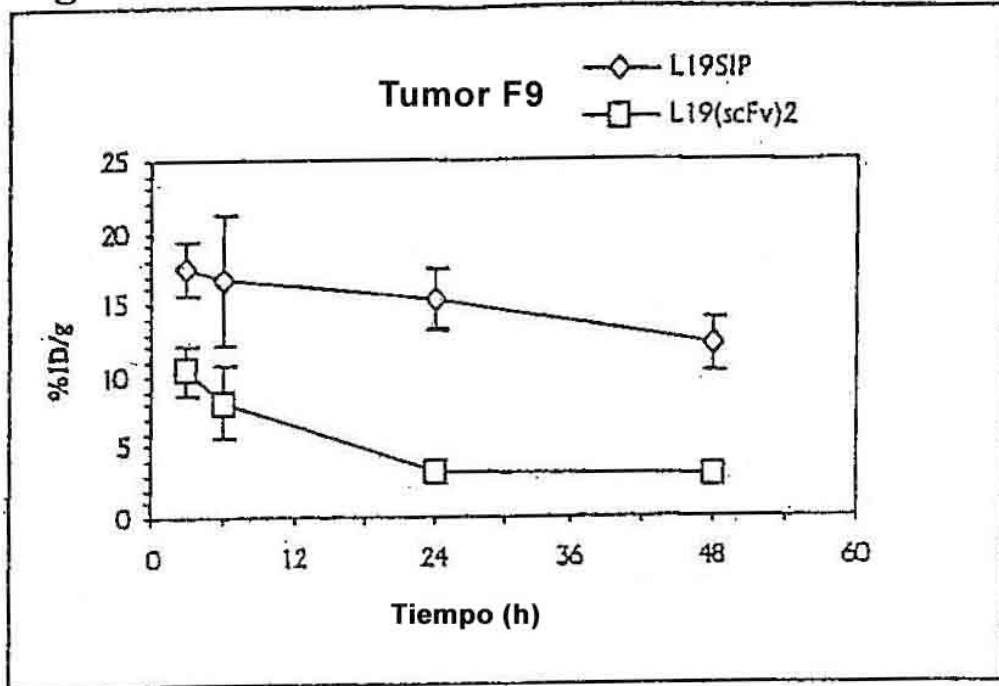
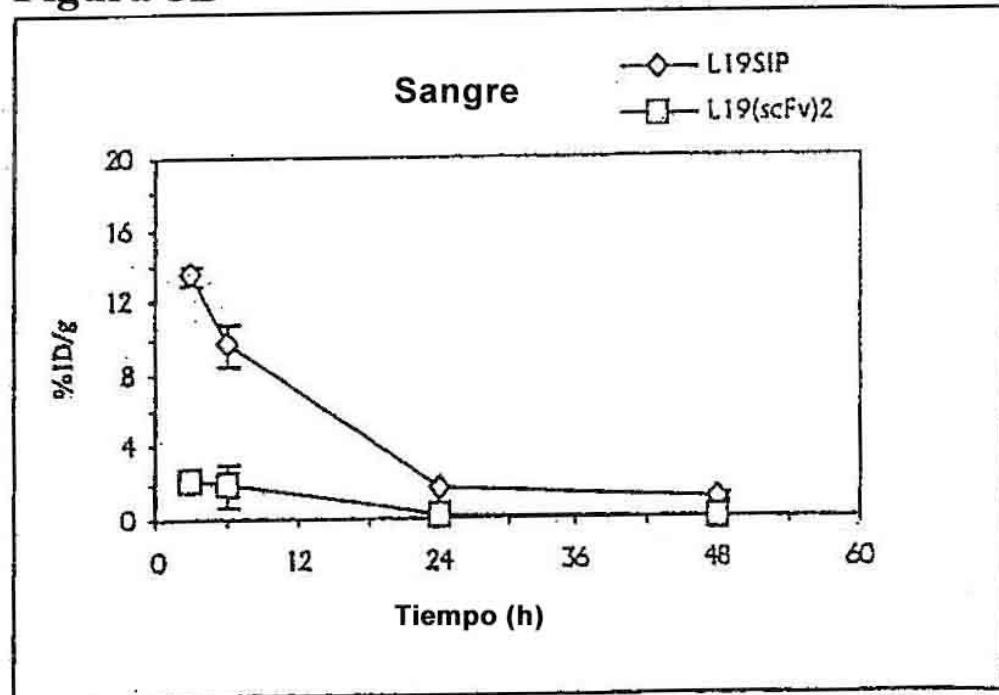


Figura 5B



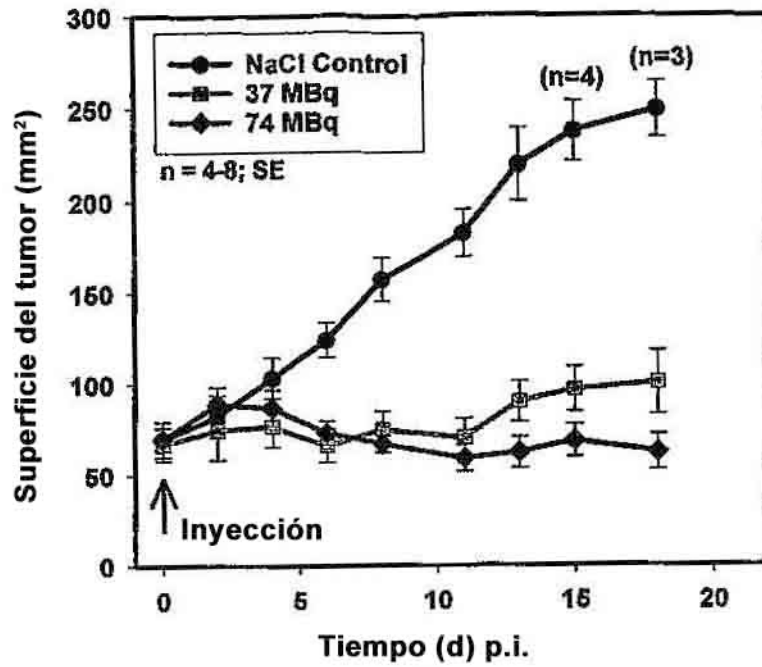


Figura 6