

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 966**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07K 14/525** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**C07K 14/57** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06014358 .3**  
96 Fecha de presentación: **22.02.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1719528**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ANGIOGÉNESIS EN LESIONES PATOLÓGICAS.**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.02.2012**

73 Titular/es:  
**PHILOGEN S.P.A.**  
**LA LIZZA 7**  
**53100 SIENA, IT**

72 Inventor/es:  
**Zardi, Luciano;**  
**Neri, Dario;**  
**Carnemolla, Barbara;**  
**Nilsson, Fredrik;**  
**Tarli, Lorenzo;**  
**Borsi, Laura y**  
**Halin, Cornelia**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 373 966 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

La presente invención se refiere al tratamiento de las lesiones de la angiogénesis patológica, especialmente los tumores, artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, y angiomas. Aspectos de la presente invención emplean un conjugado o fusión de una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana en las lesiones y un anticuerpo dirigido contra un componente de la matriz extracelular que está presente en este tipo de lesiones. El anticuerpo está dirigido contra la fibronectina ED-B. La molécula biocida o citotóxica es factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Al dirigirse a las moléculas bioactivas a un componente de la matriz extracelular, se puede lograr causar la muerte de las células diana.

Los tumores no pueden crecer más allá de una cierta masa sin la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y se ha informado una correlación entre la densidad de los microvasos y la capacidad invasiva del tumor de una serie de tumores (1). Moléculas capaces de dirigirse de forma selectiva a los marcadores de la angiogénesis crean oportunidades clínicas para el diagnóstico y el tratamiento de tumores y otras enfermedades caracterizadas por la proliferación vascular, como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad (2-8).

El dominio ED-B de la fibronectina, una secuencia de 91 aminoácidos idénticos en ratones, ratas y humanos, que se inserta por empalmado alternativo en la molécula de fibronectina, en concreto se acumula alrededor de las estructuras neovasculares y representa un objetivo de la intervención molecular (9-11). Con el uso de un anticuerpo recombinante humano (L19) para el dominio ED-B, se ha demostrado la posibilidad del marcado de neovasculatura *in vivo* en diferentes modelos tumorales (12,13).

La presente invención se basa en el trabajo experimental de los inventores empleando un anticuerpo dirigido contra el dominio ED-B de la fibronectina, que se encuentra en la angiogénesis en las lesiones patológicas tales como tumores, conjugado con las moléculas que ejercen efectos biocidas o citotóxicos en las células diana. Algunas de dichas moléculas pueden interactuar con un receptor unido a la membrana de la célula diana o perturbar el potencial electroquímico de la membrana celular. Moléculas ejemplares demostradas experimentalmente en este documento incluyen la interleucina-2 (IL-2), factor tisular, doxorubicina, interleucina-12 (IL-12), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ). La presente invención se refiere a conjugados con TNF $\alpha$ .

El Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) es una citoquina producida por muchos tipos celulares, principalmente monocitos y macrófagos activados. Se expresa como un proteína precursora integral transmembrana 26 kDa de la cual se libera una proteína madura de aproximadamente 17 kDa por escisión proteolítica. El TNF $\alpha$  bioactivo soluble es un homotrímero que interactúa con dos receptores diferentes de la superficie celular (Tartaglia L.A., et al J. Biol. Chem., 268: 18542-18548, 1993) p55TNFR (50-60 kDa) y p75TNFR (75-80 kDa). p75TNFR es específico de especie, de hecho, el TNF $\alpha$  humano no se une a este receptor de ratón.

El TNF $\alpha$  puede inducir necrosis hemorrágica de tumores sólidos trasplantados, *in vivo* (Carswell EA, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 3666-3670, 1975), y puede ejercer la actividad citotóxica *in vitro* contra algunas líneas de células tumorales (Helson L., et al, Nature, 258: 731-732. 1975).

La eficacia anti-tumoral de TNF $\alpha$  en algunos modelos animales abrigaban la esperanza de su posible uso como agente terapéutico en el cáncer humano. Los ensayos clínicos realizados para demostrar la eficacia antitumoral de TNF $\alpha$ , sin embargo, demostró que dosis terapéuticamente efectivas sistemáticamente administrado fueron acompañadas por niveles inaceptablemente altos de toxicidad sistémica, siendo la hipotensión el efecto tóxico más común que limita la dosis. Por otra parte, TNF $\alpha$  tiene una evacuación muy rápida de la sangre (vida media plasmática en general menor de 30 minutos) (Blick M.m et al. Cancer Res., 47: 2989, 1987), lo que disminuye la concentración hemática en los niveles terapéuticos, muy rápidamente. Se han logrado buenos resultados clínicos en los seres humanos sólo en los tratamientos loco-regional de tumores no diseminados (por ejemplo, extremidades aisladas de la perfusión para el sarcoma y el melanoma) (Franker D.L., et al, Important Adv. Oncol. 179-192, 1994).

La actividad anti-tumoral de TNF $\alpha$  en muchos modelos animales parece ser debida a una combinación de un efecto tóxico directo (en combinación con factores derivados de los tumores que actúan sinérgicamente con TNF $\alpha$ ) en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del tumor en crecimiento (Clauss M., et al. J. Biol Chem., 265:7078-7083, 1990a), así como a las alteraciones de las propiedades hemostáticas de la proliferación de células endoteliales en la angiogénesis tumoral (Clauss., et al J. Exp. Med. 172: 1535-1545, 1990b). También hay evidencia de un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales. Los efectos indirectos (mediados por el huésped) de TNF $\alpha$ , tales como la inmunidad dependiente de la inducción de células T, puede contribuir a la regresión de tumores en modelos animales (Palladino Jr. M.A., et al. J Immunol., 138:4023-4032, 1987).

En los experimentos descritos a continuación, los inventores construyeron y expresaron en células de mamífero una proteína de fusión anticuerpo murino-TNF $\alpha$  (mTNF $\alpha$ ), siendo el anticuerpo L19 dirigido contra un componente de la ECM presente en la angiogénesis en las lesiones patológicas (en particular, B-FN). Experimentos de biodistribución

*in vivo* en ratones portadores de tumores demostraron la acumulación de la proteína de fusión en torno a la formación de nuevos vasos sanguíneos del tumor. La proteína de fusión se ha probado en experimentos terapéuticos en animales con tumores y, sorprendentemente, se encontró que induce un efecto anti-tumoral y que es activo en la reducción del crecimiento del tumor.

5 Breve descripción de las figuras

10 La figura 1 muestra una representación esquemática de la construcción ADNc TNF $\alpha$  L19-m scFv. ADNc TNF $\alpha$  L19-m scFv fueron fusionados genéticamente con una codificación de ADN de unión de 15 aminoácidos (SSSSG)<sub>3</sub> y clonado en el vector de expresión de mamíferos ADNpc utilizando los sitios de restricción HindIII y NotI. La caja rayada representa la secuencia del promotor CMV, la caja llena de la secuencia genómica del péptido líder de señal de secreción (--intrón dentro de la secuencia genómica) y las cajas en blanco el VH o VL de scFv-L19 y la secuencia mTNF $\alpha$ . T7, BC679, BC742 y BC749 y cebadores utilizados en las amplificaciones de PCR se describen en Materiales y Procedimientos.

15 La figura 2 muestra la actividad biológica de la porción mTNF $\alpha$  de la proteína de fusión (■) y de mTNP $\alpha$  recombinante (▲), medido mediante el ensayo de citotoxicidad en fibroblastos de ratón L-M (ver Materiales y Procedimientos en el ejemplo 1).

20 La figura 3 es un gráfico (en función del tiempo) del volumen de carcinoma de colon murino C51 implantado por vía subcutánea en ratones Balb/C, que se inyecta por vía intravenosa, ya sea con scFv (L19)-mTNF $\alpha$  o PBS (como control negativo). La inyección es indicada por la flecha y se realizó cuando los tumores eran de aproximadamente 100 a 200 mm<sup>3</sup>. Los errores estándar se indican.

25 La invención proporciona el uso de un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana mediante interacción celular, es decir Factor- $\alpha$  de Necrosis Tumoral (TNF $\alpha$ ), y (ii) una sola cadena Fv específica uniéndose a elementos específicos para un componente de la matriz extracelular que está presente en la angiogénesis en las lesiones patológicas, es decir, fibrorectina ED-B, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la angiogénesis patológica.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana por interacción celular, es decir, TNF $\alpha$  y (ii) una sola cadena FV específica que se une a un elemento específico de un componente de la matriz extracelular que está presente en la angiogénesis en las lesiones patológicas, es decir, fibrorectina ED-B, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Dicho tratamiento puede ser de lesiones patológicas que comprenden la angiogénesis.

35 Un aspecto adicional de la invención proporciona un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico sobre las células diana mediante interacción celular, es decir, TNF $\alpha$  y (ii) una sola cadena Fv que se une específicamente a un elemento específico de un componente de la matriz extracelular que está presente en la angiogénesis en las lesiones patológicas, es decir, fibrorectina ED-B. Dicho conjugado de preferencia comprende una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y un dicho elemento de unión específico.

40 El elemento de unión específica es una molécula de cadena simple Fv del anticuerpo, es decir, scfv. Así, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende la molécula biocida o citotóxica y una molécula de anticuerpo de cadena simple Fv específica para un componente de la matriz extracelular que está presente en las lesiones que comprenden la angiogénesis, especialmente un componente de la matriz extracelular asociado a los tumores.

45 El componente que permite el marcado discriminatorio de la matriz extracelular de las lesiones patológicas en comparación con lo normal es la fibronectina ED-B.

50 El elemento de unión específica es un anticuerpo de cadena simple Fv. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende una sola cadena de anticuerpo y la molécula biocida o citotóxica.

55 El elemento de unión específica es específico para la fibronectina ED-B.

60 Un sitio de unión antígeno-anticuerpo utilizado en un elemento de unión específica de acuerdo con la presente invención puede incluir los dominios VH y/o VL del anticuerpo L19 o un anticuerpo que compita con L19 de la unión a ED-B. Las secuencias de dominio L19 VH y L19 VL se exponen en Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776.

Como se ha señalado, de preferencia el elemento de unión específica se conjuga con la molécula de biocida o citotóxica por medio de un enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el elemento de unión específica o un componente de la cadena polipeptídica del mismo.

Otros medios para la conjugación incluyen conjugación química, especialmente de entrecruzamiento usando un reactivo bifuncional (por ejemplo, el empleo de ADOUBLE-REAGENTS™ @ Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

5 Cuando es deseable una liberación lenta, por ejemplo, cuando la molécula de biocida o citotóxica es doxorubicina u otra molécula que perturba el potencial electroquímico de la membrana celular, la conjugación química puede ser por medio de la formación de una base de Schiff (imina) entre un amino grupo primario del elemento de unión específica (un polipéptido tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) y un resto de azúcar oxidado (daunosamina) de la molécula biocida o citotóxica como la doxorubicina.

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

15 La lesión ocular puede ser, por ejemplo, derivada de la degeneración macular relacionada con la edad, en el que la angiogénesis surge a partir de vasos coroideos.

20 Elemento de unión específica

Esto describe un elemento de un par de moléculas que tienen la especificidad de unión uno por el otro. Los elementos de un par de unión específica pueden ser de origen natural o total o parcialmente producidos sintéticamente. Uno de los elementos de la pareja de moléculas tiene un área de su superficie, o una cavidad, que se une específicamente y por lo tanto es complementaria a una determinada organización espacial y polar del otro elemento de la pareja de moléculas. Así, los elementos de la pareja tienen la propiedad de unirse específicamente al otro.

Anticuerpo

30 Esto describe una inmunoglobulina ya sea natural o parcial o totalmente producida sintéticamente. El término también incluye cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es sustancialmente homólogo a, un dominio anticuerpo-antígeno de unión. Estos pueden ser derivados a partir de fuentes naturales, o pueden ser parcial o totalmente producidos sintéticamente. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina y sus subclases isotópicas; fragmentos que componen un dominio de unión al antígeno, como Fab, scFv, Fv, DAB, Fd, y diacuerpos.

35 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y utilizar técnicas de la tecnología del ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Estas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina o regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de estructura, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Un híbrido u otras células que producen un anticuerpo pueden estar sujetos a la mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

40 Como los anticuerpos pueden ser modificados en un número de maneras, el término "anticuerpo" debe ser interpretado cubriendo cualquier elemento de unión específica con un dominio de unión anticuerpo-antígeno de dominio de unión con la especificidad necesaria. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintética. Las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido son por lo tanto incluidas. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

45 Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de los antígenos de unión. Ejemplos de fragmentos de unión son: (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo, (iv) el fragmento de dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544 a 546 (1989)), que consta de un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un péptido de unión que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988, Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988), (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena simple (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión de genes (WO94/13804, P. Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6.444-6.448, 1993). Fv, scFv o

moléculas diacuerpo pueden ser estabilizados mediante la incorporación de puentes de disulfuro que unen los dominios VH y VL (Y. Reiter et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). Minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 también pueden hacerse (S. Hu et al, Cancer Res., 56, 3.055-3061, 1996).

## 5 Dominio de unión al antígeno

10 Esto describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a la totalidad o parte de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte específica del antígeno, dicha parte se denomina epítipo. Un dominio de unión al antígeno puede ser proporcionada por uno o más dominios variables de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo llamado Fd que consiste en un dominio VH). Preferiblemente, un dominio de unión al antígeno comprende una región variable de anticuerpo de cadena ligera (VL) y una región variable de anticuerpo de cadena pesada (VH).

### 15 Específico

Esto puede ser usado para referirse a la situación en la que un elemento de un par de unión específico no muestra ninguna unión significativa a otras moléculas aparte de su(s) socio(s) de unión específica. El término también es aplicable cuando por ejemplo, un dominio de unión al antígeno es específico para un epítipo particular que es llevado a cabo por una serie de antígenos, en cuyo caso el elemento de unión específica que lleva el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que lleva el epítipo.

### 20 Comprende

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

### Aislado

30 Se refiere al estado en el que elementos específicos de la unión de la invención, o un ácido nucleico que codifica dichos elementos de unión, por lo general se emplearán de acuerdo con la presente invención. Los elementos y el ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres del material con el que se asocian naturalmente, como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que son preparados (por ejemplo, cultivo celular), cuando dicha preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los elementos y ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y todavía, a efectos prácticos, ser aislados - por ejemplo, los elementos normalmente se mezclarán con gelatina u otros portadores si se utilizan para revestir las placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilizan en el diagnóstico o tratamiento. Elementos de unión específicos pueden ser células eucariotas heterólogas glicosiladas, ya sea naturalmente o mediante sistemas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden ser (por ejemplo si se produce mediante la expresión en una célula procarionota) no glicosiladas.

45 Como se ha señalado, en donde se va a emplear un antígeno-anticuerpo dirigido contra el dominio de unión fibronectina ED-B en las realizaciones de la presente invención, un dominio como tal preferido comprende los dominios L19 anticuerpo VH y VL. Formas modificadas de uno u otro de estos dominios pueden ser empleados en otras realizaciones, por ejemplo, el dominio de L19 VH o L19 VL en los que 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos se han hecho en un CDR, por ejemplo, CDR3, y/o FR, cuyos elementos específicos de unión retienen capacidad de unir la fibronectina ED-B. Tales sustituciones de aminoácidos son generalmente "conservadoras", por ejemplo, la sustitución de un residuo hidrófobo como la isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, como la arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico, o la glutamina por asparagina. En ciertas posiciones son permitidas sustituciones no conservadoras.

50 La presente invención también se extiende a emplear un elemento de unión específica que compite con el anticuerpo L19 para la unión a la fibronectina ED-B. La competencia entre los elementos de unión puede ser analizada fácilmente *in vitro*, por ejemplo mediante el etiquetado de una molécula reportera específica a un elemento de unión que se puede detectar en la presencia de otro(s) elemento(s) de unión sin etiquetar, para permitir la identificación de determinados elementos de unión que se unen al mismo epítipo o un epítipo superpuesto.

60 Además de las secuencias de anticuerpos, un elemento de unión específica empleado de conformidad con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, la formación de un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o impartir a la molécula otra de las características funcionales, además de la capacidad para unirse al antígeno. Elementos de unión específica de la invención pueden llevar una marca detectable.

Elementos de unión específica de acuerdo con la invención pueden ser utilizados en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal, como un procedimiento de 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 efectiva de un elemento de unión específica de la invención. Condiciones tratables, de acuerdo con la presente invención se describen más adelante en este documento.

5 Por consiguiente, aspectos adicionales de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los elementos de la unión específica, y el uso de un elemento de unión específica en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo, en un procedimiento de fabricación de un medicamento o composición farmacéutica que comprenda la formulación del elemento de unión específica con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Siempre que las composiciones se puedan administrar a las personas. La  
10 administración es preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente efectiva", siendo esto suficiente para demostrar un beneficio a un paciente. Dicho beneficio puede ser por lo menos la mejoría de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la frecuencia y el curso temporal de la administración, dependerá de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., se encuentra dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros médicos. Las dosis adecuadas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica, ver Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Inmunconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la condición a tratar.

20 Elementos de unión específica de la presente invención, incluidos los que comprenden un dominio de unión antígeno-anticuerpo, se puede administrar a un paciente en necesidad de tratamiento a través de cualquier vía adecuada, por lo general mediante una inyección en el torrente sanguíneo y/o directamente en el sitio de tratar, por ejemplo, el tumor. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, la vía de tratamiento, el tamaño y la  
25 ubicación de la zona a tratar (tumor, por ejemplo), la naturaleza precisa de los anticuerpos (por ejemplo, todo el anticuerpo, molécula scFv), y la naturaleza de cualquier marca detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis típica de anticuerpos estará en el rango de 10-50 mg. Esta es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que puede ser ajustada proporcionalmente para niños y bebés, y también ser ajustada a los formatos de otros anticuerpos en proporción a su peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos de  
30 una vez al día, dos veces por semana, semanales o mensuales, según el criterio del médico.

Los elementos de unión específica de la presente invención por lo general se administran en forma de una composición farmacéutica, que puede incluir al menos uno de los componentes, además de los elementos de unión específica.

35 Así, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, portador, tampón, estabilizador u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador o cualquier otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa.

45 Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que esté libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos relevantes en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

50 Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la condición a tratar. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de medicamentos para aliviar el dolor, como fármacos anti-inflamatorios no-esteroides (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o quetoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o antieméticos.

55 La presente invención proporciona un procedimiento que comprende causar o permitir la unión de un elemento de unión específica según lo aquí establecido a un componente de la matriz extracelular que está presente en la angiogénesis en las lesiones patológicas. Como se ha señalado, tal unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo, tras la administración de un elemento específico de unión, o ácido nucleico que codifica un elemento de unión específica.

60 Otros aspectos y realizaciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia, dada la presente descripción. Aspectos y realizaciones de la invención se ilustran en la siguiente sección experimental.

EXPERIMENTAL

Ejemplo 1

5 *Construcción y actividad antitumoral in vivo de la fusión de anticuerpos mTNF $\alpha$ .*

Materiales y Procedimientos

10 *Construcción y expresión de la proteína de fusión L19-M TNFA.* El ADNc 119-m TNF $\alpha$  fue construido por la fusión de una secuencia sintética que codifica TNF $\alpha$  del ratón (Pennica et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6060-6064, 1985) para el extremo 3' de la secuencia codificante para el scFV L19. La representación esquemática de la construcción de ADNc L19-mTNF $\alpha$  se muestra en la Figura 1. TNFA ADNc fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores BC742 y BC749 y, como modelo el m-TNF $\alpha$  ADNc (producido por la reacción en cadena de polimerasa transcriptasa reversa RT-PCR) a partir de ARN obtenido a partir del bazo de los ratones inmunizados.

15 El cebador directo (BC742) para el ratón TNFA (secuencia: 5'CTCGAATTCTTCTTCATCGGGTAGTAGCTTCCGGCTCATCGTCCAGCGGCCTCAG ATCATCTTCTCAAAT3') contenía la secuencia de la enzima de restricción EcoRI, una 45 pb codificando 15 amino ácidos de unión (Ser,-Gly)<sub>3</sub> y 21 bases de la secuencia TNF $\alpha$  de ratón madura (Pennica et al., 1985).

20 El cebador inverso AC-749 (secuencia 5'CTCGCGGCCGCTCATCACAGAGCAATGACTCCAAAGTA3') contenía 21 bases de TNF $\alpha$  de ratón maduro (Penca et al., 1985, dos codones de terminación y la secuencia de la enzima de restricción Not I.

25 El scFv L19, que contenía en su extremo 5' la secuencia genómica del péptido de secreción de señal según lo informado por Li et al (Protein Engineering, 10:731, 1996 o 1997), fue amplificado mediante PCR usando el cebador T7 en el vector pcADN3.1 (Invitrogen, Croningen, Países Bajos) y el cebador BC 679 (secuencia: CTCGAATTCTtgattccacctgtgccc) que contiene 21bp del extremo 3' de la L19 y la secuencia de la enzima de restricción EcoRI.

30 El gen de fusión fue secuenciado, introducido en el vector pcADN3.1 que contiene el citomegalovirus (CMV) y se expresa en las células p3U1 en presencia de G418 (750 mg/ml, Calbiochem, San Diego, CA). Clones de células resistentes a G418 fueron seleccionados para la secreción de la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  mediante ELISA utilizando el dominio recombinante de ED-B de la fibronectina humana (FN) como antígeno para L19 y anticuerpo policlonal TNF $\alpha$  anti-murino de conejo (Pepro Tech, Reino Unido) como reactivos específicos para mTNF $\alpha$  inmunorreactivo.

40 *Fragmentos recombinantes FN, inmunoensayo ELISA y purificación de la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$*

45 El fragmento recombinante ED-B FN se produjo según lo descrito por Carnemolla et al (Int. J. Cancer, 68:397, 1996). El inmunoensayo ELISA se realizó según lo informado por Carnemolla et al (1996). La proteína de fusión L19-M TNFA se purificó a partir del medio acondicionado de un clon positivo utilizando el fragmento ED-B de fibronectina humana recombinante conjugado con Sefarosa, mediante cromatografía de afinidad, según lo informado por Carnemolla et al (1996). El tamaño de la proteína de fusión se analizó en condiciones de reducción en SDS-PAGE y en condiciones nativas mediante FPLC en una columna de cromatografía Superdex S-200 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

50 Ensayo de citotoxicidad L-M

55 La actividad biológica mTNF $\alpha$  de la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  se determinó mediante el ensayo de citotoxicidad con fibroblastos de ratón LM como se describe por Corti et al (J. Immunol. Methods, 177: 191-194, 1994). Diluciones seriadas de la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  y de mTNF $\alpha$  recombinante ( $2 \times 10^7$  unidades/mg) en las concentraciones de 1000 a 0,4 pg/ml se utilizaron en el ensayo citotóxico. Los resultados se expresan como un porcentaje de células viables con respecto a los controles negativos.

Animales y líneas celulares

60 Ratones machos y hembras 129 y Balb-C (8 semanas de edad) se obtuvieron de Harlan Italia (Correzzana, Milano, Italia). F9, un carcinoma embrionario del ratón, fibroblastos de ratón LM y células de mieloma de ratón p3U1 se adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), se utilizó C51, una línea celular de adenocarcinoma de colon de ratón derivada de ratones Balb/C (Colombo et al., Cancer metastasis Rev., 16:421-432, 1997).

Biodistribución de proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$

5 L19-mTNF $\alpha$  purificada fue radiomarcada con yodo-<sup>125</sup> utilizando el procedimiento de Iodogen (Salacinski et al., Anal. Biochem., 117: 136, 1981) (Pierce, Rockford, IL). Después del etiquetado, la inmunoreactividad fue superior al 90%.  
 10 129 ratones con F9 teratocarcinoma murino implantado por vía subcutánea fueron inyectados por vía intravenosa con 4 $\mu$ g (2 $\mu$ Ci) de proteínas en solución salina 100 $\mu$ l. Tres animales fueron utilizados para cada momento. Los ratones fueron sacrificados a las 3, 6, 24 y 48 horas después de la inyección. Los órganos fueron pesados y se contó la radioactividad. Todos los órganos y los tumores se colocaron en fijador para el análisis histológico y microautoradiográfico. Los resultados de focalización de los órganos de representación se expresan como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

Tratamiento in vivo con proteína de fusión L19 mTNF $\alpha$

15 El tratamiento con L19-mTNF $\alpha$  proteína de fusión purificada fue preformada en grupos de 3 ratones Balb.C inyectados cada uno por vía subcutánea con 10<sup>6</sup> células de C51. En el día 12 después de la inyección de células C51, 0,8  $\mu$ g/g de proteína de fusión L19-TNF $\alpha$  se inyecta en la vena de la cola de cada animal. Un grupo similar de tres animales fue inyectado con tampón fosfato salino, pH 7,4 (PBS). Los animales fueron seguidos para toxicidad sistémica (pérdida de peso) y el crecimiento del tumor diariamente durante 6 días. Al final, los animales fueron sacrificados y los tumores se colocaron en fijador para el análisis histológico y se congelaron para el análisis  
 20 inmunohistoquímico.

Análisis de microautoradiografía e inmunohistoquímica

25 Las muestras de tumor y de órganos fueron procesados para microautoradiografía para evaluar el patrón de distribución de las proteínas de fusión <sup>125</sup>I-L19TNF $\alpha$  dentro de los tumores u órganos descritos por Tarli et al (Blood, 94: 192-198, 1999). Procedimientos de inmunohistoquímica se llevaron a cabo según lo informado por Castellani et al (Int. J. Cancer, 59: 612-618, 1994).

Resultados

30 La construcción L19-mTNF $\alpha$  y selección de clones que expresan la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  clones resistentes G418 fueron seleccionadas para la especificidad de anticuerpos de los sobrenadantes de la secuencia ED-B y para mTNF $\alpha$  inmunorreactiva mediante ELISA, tal como se describe en Materiales y Procedimientos.

35 Los sobrenadantes de los clones que muestran especificidad inmunológica para la secuencia ED-B y mTNF $\alpha$  inmunorreactiva se ensayaron para la actividad biológica de TNFA en el ensayo de citotoxicidad LM (ver Materiales y Procedimientos).

40 La proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  se purifica en un procedimiento de dos pasos:

- a) mediante cromatografía de inmunoafinidad, la columna de sefarosa ED-B seguida por
- b) cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, Pharmacia)

45 En SDS-PAGE, la proteína de fusión mostró una masa molecular aparente de aproximadamente 42 kDa, como se esperaba. Tanto la actividad inmunológica del componente scFv L19 y la actividad biológica del componente mTNF $\alpha$  en la proteína purificada se pusieron a prueba.

*Biodistribución de radiomarcado de proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  en ratones portadores de tumores*

50 Para investigar si la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  fue capaz de localizarse de manera eficiente en los vasos tumorales, como se informó para scFv L19 por Tarli et al (Blood, 94: 192-198, 1999), los experimentos de biodistribución se realizaron en ratones portadores de teratocarcinoma F9.

55 La proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  se mostró mediante inmunohistoquímica para teñir fuertemente los vasos sanguíneos del tumor glioblastoma. La proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  radioyodada se inyecta en la vena de la cola de los ratones por vía subcutánea con tumores F9 implantados, y la distribución de la proteína de fusión L19-TNF $\alpha$  se obtuvo en diferentes momentos: 3, 6, 24 y 48 horas. Como se informó en la Tabla I, el 22% de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) se localizó en el tumor 3 horas después de la inyección y después de 48 horas más del  
 60 9% ID/g todavía estaba en el tumor. La localización de la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  en la vasculatura tumoral fue confirmada por análisis microradiográfico. La acumulación de la proteína de fusión radiomarcada se demostró en los vasos sanguíneos del tumor del ratón F9. No se ha detectado acumulación de la proteína de fusión radiomarcada en los vasos de los demás órganos de los ratones portadores del tumor.

*Tratamiento de ratones portadores del tumor con la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$ .* La eficacia de la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  en la supresión del crecimiento tumoral fue probada en un modelo experimental de tumor de adenocarcinoma de ratón, C51. Para la inducción de tumores, 10<sup>6</sup> de células C51 fueron inyectados por vía subcutánea en ratones Balb/animales C. Después de 12 días (cuando el tumor alcanza aproximadamente 100-200mm<sup>3</sup>) los animales recibieron inyecciones intravenosas de PBS (3 animales) o proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  (3 animales). Los animales fueron controlados mediante el peso y el crecimiento del tumor diariamente durante 6 días. Los resultados, resumidos en la figura 3, muestran una disminución en el crecimiento del tumor en el grupo de animales tratados con la proteína de fusión L19-mTNF $\alpha$  con respecto a los animales inyectados con PBS (las barras representan SE). La pérdida de peso fue siempre inferior al 6% durante todo el tiempo del experimento.

Referencias

- 1) Folkman Nat. Med. 1, 27, 1995.
- 2) O'Reilly et al. Nat. Med. 2: 689, 1996.
- 3) O'Reilly et al. Cell, 88, 277, 1997.
- 4) Friedlander et al. Science, 270: 1500, 1995.
- 5) Pasqualini et al. Nat. Biotechnol. 15: 542, 1997.
- 6) Huang et al. Science, 275: 547, 1997.
- 7) Kim et al. Nature, 362: 841, 1993.
- 8) Schmidt-Erfurth et al. Br. J. Cancer, 75: 54, 1997.
- 9) Zardi et al. EMBO J., 6, 2331 a 2342 (1987).
- 10) Carnemolla et al. J. Cell., 108, 2139-1148 (1989).
- 11) Castellani et al. Int. J. Cencer, 59, 612-618 (1994).
- 12) Tarli et al. Brood, 94: 192-198, 1999.
- 13) Viti et al. Cancer Res. 59: 347, 1999.
- 14) Taniguchi et al. Cell 73:5-8, 1993.
- 15) Rosenberg J. Clin. Oncol. 10:180-199, 1992.
- 16) Siegel and Puri interleukin-2 toxicity. J. Clin. Oncol. 9:694-704, 1991.
- 17) Lode et al. Pharmacol. Ther. 80:277-292, 1998.
- 18) Meazza et al. Br. J. Cancer, 74: 788-795, 1996.
- 19) Li et al. Proteins Engineering, 10: 731, 1997.
- 20) Carnemolla et al. Int. J. Cancer 68:397, 1996.
- 21) Colombo et al. Cancer Metastasis Rev. 16:421-432, 1997.
- 22) Salacinski et al. Anal. Biochem. 117:136, 1981.
- 23) Neri et al. Nat. Biotechnol. 15:1271, 1997.

Tabla 1 Biodistribución de la proteína de fusión L19-TNF $\alpha$  radiomarcada en ratones portadores de tumores

ES 2 373 966 T3

% ID/g											
Tiempo (h)	Tumor	Sangre	Piel	Hígado	Bazo	Riñón	Vejiga	Tiroides	Corazón	Pulmón	Músculo
	22,02 ± 2,3	8,39 ± 5,0	2,83 ± 1,3	8,42 ± 1,9	9,08 ± 2,0	7,96 ± 3,0	37,52 ± 26,7	3,21 ± 0,8	2,69 ± 0,7	6,56 ± 1,7	1,33 ± 0,3
6	11,57 ± 2,7	2,13 ± 0,9	1,68 ± 0,9	2,39 ± 0,9	3,29 ± 0,9	6,06 ± 5,2	18,14 ± 9,1	2,91 ± 1,8	1,32 ± 0,5	2,79 ± 1,4	0,76 ± 0,2
24	9,77 ± 1,4	0,09 ± 0,0	0,03 ± 0,0	0,15 ± 0,0	0,13 ± 0,0	0,18 ± 0,0	2,9 ± 2,2	1,93 ± 0,5	0,06 ± 0,0	0,198 ± 0,1	0,05 ± 0,0
48	9,55 ± 1,7	0,01 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,08 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,0 ± 1,0

Los estudios de biodistribución se realizaron como se describe en Materiales y Procedimientos Abreviatura: % ID/g por ciento de dosis de la proteína de fusión L19-TNFa inyectada por gramo de tejido

**REIVINDICACIONES**

- 1.** Conjugado de
- 5 (i) una cadena simple Fv (scFv) específica de elemento de unión específico para la fibronectina ED-B, y  
(ii) Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).
- 2.** Conjugado según la reivindicación 1, en el que el elemento de unión específica se conjuga con el TNF $\alpha$  por medio  
10 de un enlace peptídico.
- 3.** Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento de unión específica compete con el anticuerpo L19 para la unión a la fibronectina ED-B, siendo la secuencia de aminoácidos de L19 revelada en Pini et al (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776.
- 15 **4.** Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento de unión específica comprende uno o más dominios de anticuerpo L19 VH y/o VL, siendo las secuencias de aminoácidos de los dominios de anticuerpos L19 VH y VL revelada en Pini et al (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776.
- 20 **5.** Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el elemento de unión específica comprende los dominios del anticuerpo L19 VH y VL.
- 6.** Conjugado según la reivindicación 1, que comprende una proteína de fusión de (a) dicho elemento de unión específica y (b) TNF $\alpha$  o una cadena de polipéptidos de TNF $\alpha$  que se asocia con una segunda cadena de polipéptidos de TNF $\alpha$ .
- 25 **7.** Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo de una persona humana o un animal mediante terapia.
- 30 **8.** Conjugado según la reivindicación 7 para su uso en un procedimiento de tratamiento de la angiogénesis en lesiones patológicas.
- 9.** Conjugado según la reivindicación 8 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor.
- 35 **10.** Uso de un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la angiogénesis en las lesiones patológicas.
- 11.** Uso según la reivindicación 10, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de un tumor.

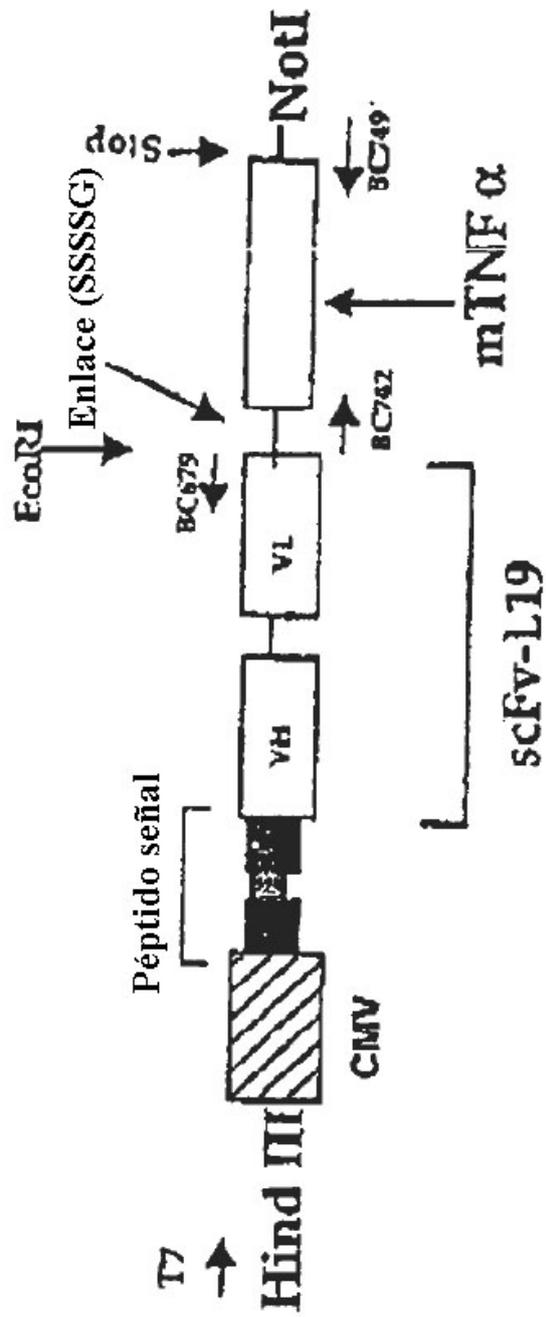


Figura 1

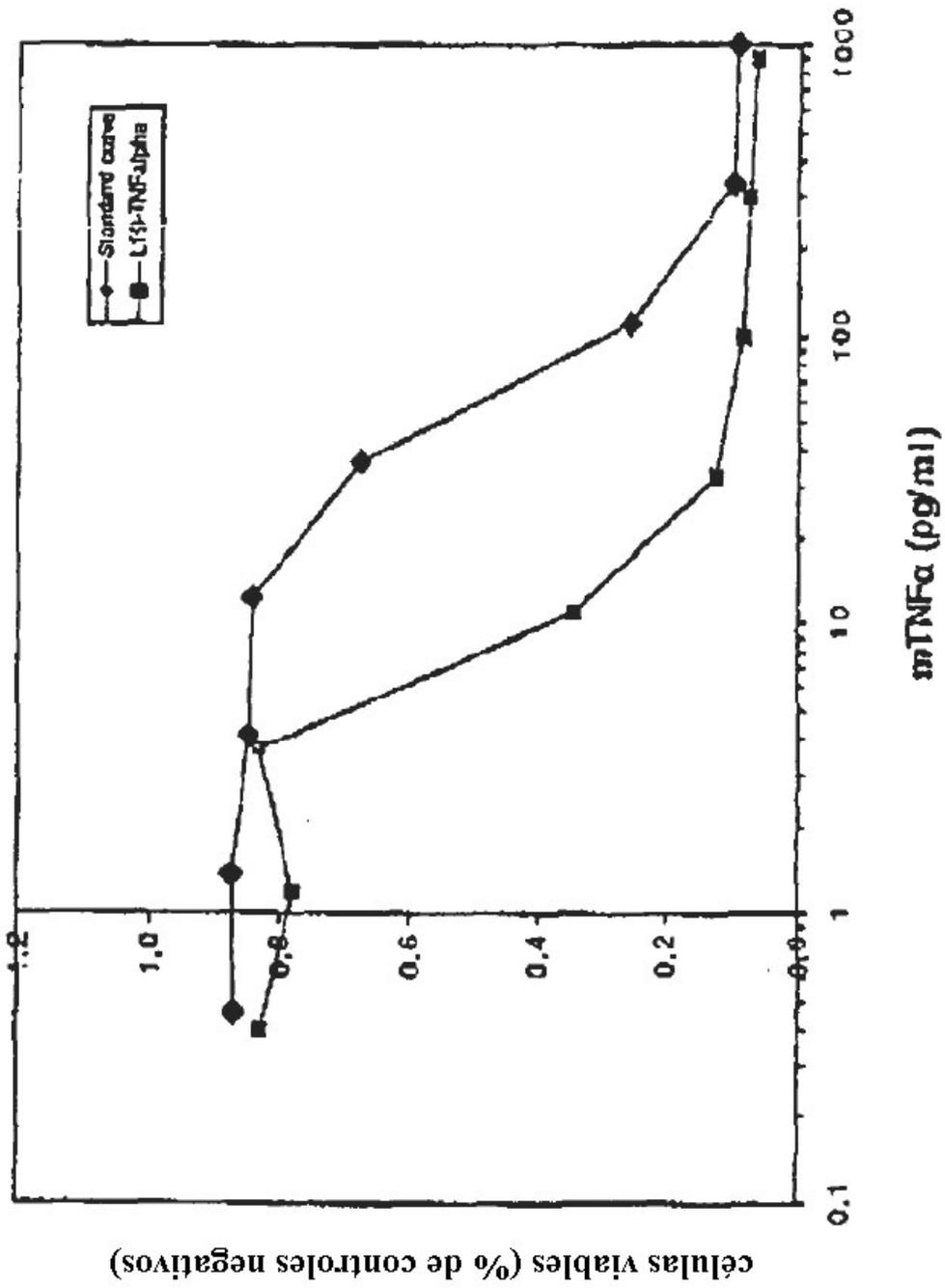


Figura 2

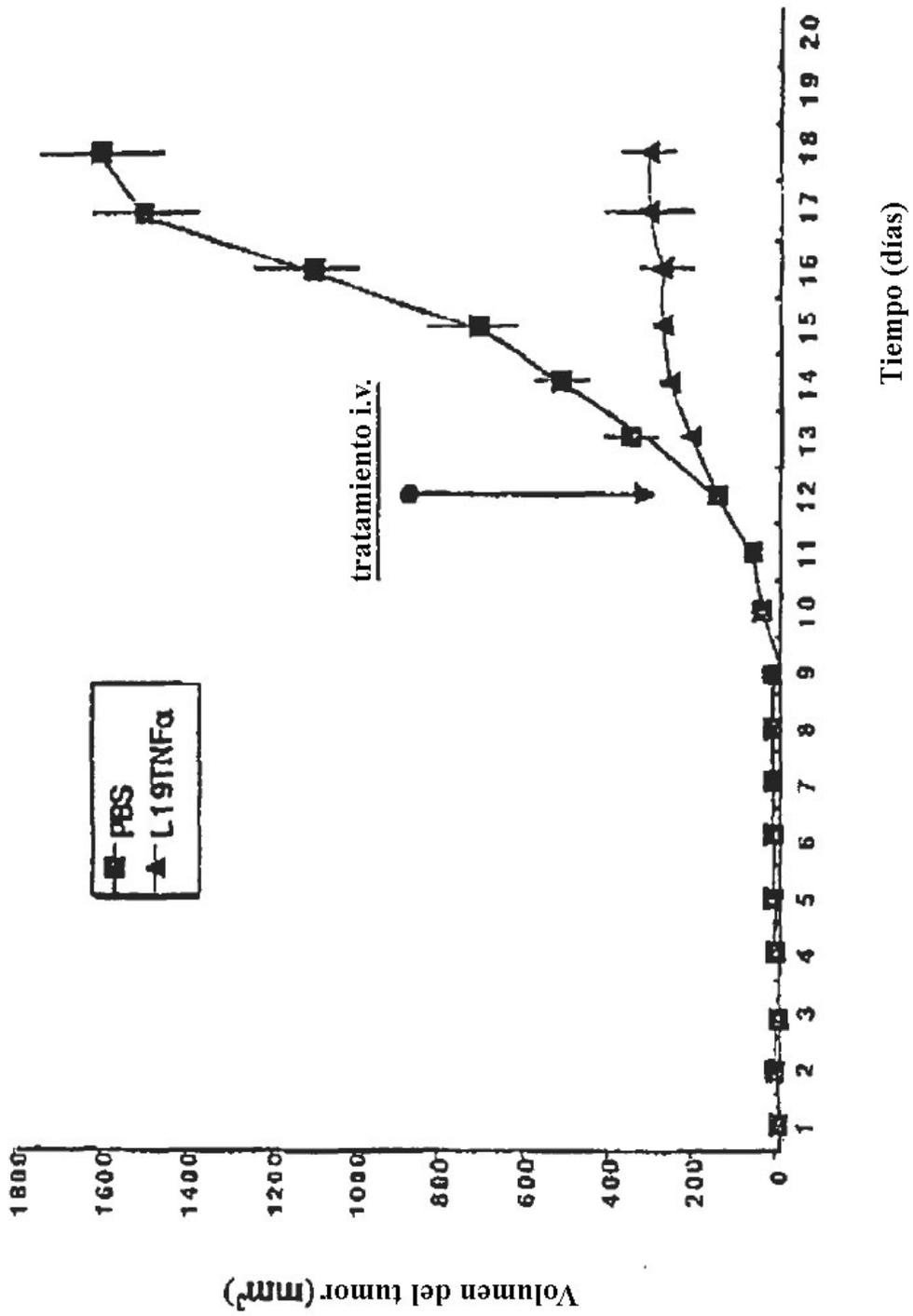


Figura 3