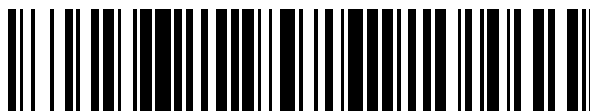


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 058**

51 Int. Cl.:  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 51/10** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 39/44** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08075044 .1**  
96 Fecha de presentación: **17.01.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2085095**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.08.2009**

54 Título: **Combinación de una proteína de fusión de un anticuerpo dirigido contra el EDB de la fibronectina-IL-2, y una molécula de unión a los linfocitos B, progenitores de los linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**Neri, Dario;**  
**Menssen, Hans Dietrich;**  
**Menrad, Andreas y**  
**Schliemann, Christoph**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 382 058 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

Combinación de una proteína de fusión de un anticuerpo dirigido contra el EDB de la fibronectina-il-2, y una molécula de unión a los linfocitos B, progenitores de los linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos

5

**[0001]** La presente invención se refiere a una combinación de una proteína de fusión de un anticuerpo dirigido contra el EDb de la fibronectina-IL-2, y una molécula de unión a los linfocitos B, progenitores de los linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos y a sus usos.

10 **[0002]** El linfoma no Hodgkin de linfocitos B (B-NHL), un grupo de tumores malignos histopatológica y clínicamente diferentes que deriva de células precursoras de los linfocitos B, es el grupo más común de tumores malignos hematológicos. Por consiguiente, los linfocitos malignos procedentes de pacientes con B-NHL expresan marcadores característicos de los linfocitos B en la superficie de estas células tales como CD20, CD23 y otros. Los B-NHL suponen cada año más de 50.000 nuevos casos diagnosticados y el 5% de las muertes relacionadas con el cáncer

15

**[0003]** El Rituximab (Rituxan<sup>®</sup>; R) es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra Egg que se une directamente al epítipo de la superficie celular CD20 expresado de manera constitutiva en la superficie de poblaciones de linfocitos B normales y malignos. Al hacerlo, el rituximab (a) desencadena la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), (b) induce la muerte celular del linfoma mediante la citólisis que depende del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad celular que depende del complemento, y (c) induce directamente la apoptosis después de la interacción del CD20 con el rituximab. Además, (d) posiblemente el rituximab presenta un efecto de vacunación causado por la presentación cruzada de antígenos de linfoma procedentes de los linfocitos B malignos muertos por el rituximab mediante las células presentadoras de antígenos y la amplificación de linfocitos T

20

25 **[0003]** citotóxicos específicos de los antígenos de linfoma (Selenko y col., 2001).  
A) ADCC: Este mecanismo supone la unión de la fracción Fc del anticuerpo a los receptores Fcy expresados en células inmunitarias con capacidades citotóxicas tales como monocitos, células asesinas naturales, y granulocitos, que a continuación daría lugar a la destrucción de los linfocitos B unidos a rituximab por fagocitosis o por liberación

30

de gránulos citotóxicos contenidos en las células inmunitarias efectoras. La ADCC se considera actualmente el mecanismo de acción principal del rituximab.  
B) CDC: Puesto que la fracción Fc del rituximab se une al complemento, la muerte de las células de linfoma se puede conseguir a través de la CDC. No obstante, recientes hallazgos en los que aún se produce la reducción de los

35

40 C) Inducción de la apoptosis: Estudios *in vitro* han demostrado que la interacción de CD20 con el rituximab desencadena una cascada de acontecimientos de señalización intracelular y la regulación selectiva por disminución de factores antiapoptóticos. También traslada CD20 hacia las balsas lipídicas y activa la caspasa mediante un aumento de la movilización de calcio (Janas y col., 2005). En pacientes con CLL, se ha encontrado que los linfocitos B en circulación presentan la activación de varias caspasas y la escisión de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) inmediatamente después de la infusión de rituximab, mucho antes de que se puedan desencadenar *in vivo* otros mecanismos potenciales tales como la ADCC (Byrd y col., 2002).

45

D) Efecto de vacunación/respuesta de los linfocitos T: Los hallazgos clínicos de que el retratamiento con rituximab llevaba asociado una respuesta media de mayor duración que la del primer tratamiento y que en aquellos pacientes que respondían al retratamiento, el efecto antitumoral del rituximab persistía mucho después de que el anticuerpo se hubiese eliminado de la circulación (Davis y col., 2000) sugiere poderosamente la implicación de un mecanismo

50

**[0004]** El tratamiento con rituximab como agente único induce respuestas importantes pero moderadas y de corta duración en pacientes con casi cualquier subtipo de linfoma de células B. No obstante, su mayor beneficio se observa cuando se combina con regímenes de quimioterapia de inducción (Coiffier, 2006). Combinado con la quimioterapia estándar, en particular con la quimioterapia de CHOP (ciclofosfamida, vincristina, adriamicina y prednisolona), el rituximab a dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> en forma de infusión intravenosa de 90 minutos el día 1 de cada ciclo de quimioterapia, incluso aumenta la tasa de curación de los pacientes con linfoma de células B grandes y difusas (DLBCL) hasta el 52% aproximadamente (Coiffier 2002, actualización de los datos de GELA OS, ASH 2007) desde el 38% con quimioterapia sola.

55

**[0005]** En linfoma indolente, la adición de rituximab a cada combinación de quimioterapia de inducción (FCM, CVP, CHOP, FND) ha dado como resultado un incremento significativo en la respuesta global y en las tasas de remisión completa así como un retraso del tiempo para la progresión de la enfermedad (Marcus, 2005; Hiddemann 2005). Sin embargo, la adición de rituximab a la quimioterapia no siempre da lugar a mejores resultados clínicos. En pacientes con linfoma de células de manto, el tratamiento con CHOP más rituximab dio como resultado una supervivencia sin progresión y una supervivencia global similares comparada con pacientes en terapia CHOP sola (Lenz y col., 2005).

**[0006]** Además de su papel establecido como tratamiento para inducir remisiones (terapia de inducción) en pacientes con B-NHL, la monoterapia con rituximab también se ha evaluado como terapia de mantenimiento para consolidar las respuestas o prolongar las remisiones. Asumiendo que 25 mg de rituximab/ml es la concentración en suero aceptable más baja, se ha encontrado que una dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> de rituximab inyectada cada tres meses es suficiente para la terapia de mantenimiento con rituximab en un estudio farmacocinético prospectivo (Gordan, 2005). Aunque algunos estudios han demostrado un beneficio clínico significativo cuando se utiliza el mantenimiento con rituximab después de la quimioterapia estándar inicial con CVP (Hoechst, 2005) o CHOP (Habermann, 2006), todavía no está claro si la terapia de mantenimiento con rituximab proporciona un beneficio adicional a los pacientes en los que éste se utilizó como parte de la quimioterapia de inducción (por ejemplo, R-CHOP).

**[0007]** Desafortunadamente y a pesar de la eficacia clínica incuestionable del rituximab en combinación con quimioterapia (por ejemplo, R-CHOP), la mayoría de pacientes con B-NHL sigue muriendo, con el tiempo, por la progresión de la enfermedad. Además, a pesar de ser un agente eficaz en el tratamiento de los B-NHL, aproximadamente el 50% de los pacientes con linfomas foliculares CD20+ en recidiva/refractarios no responde al tratamiento inicial con rituximab (resistencia innata; McLaughlin y col. 1998), y aproximadamente el 60% de los pacientes que previamente han respondido al rituximab no se beneficiarán del tratamiento con rituximab (resistencia adquirida; Davis y col., 2000). Actualmente no está claro si estas formas de resistencia al rituximab se deben a una propiedad adaptativa de los linfocitos T malignos o a un mecanismo efector alterado del sistema inmunitario del hospedador. En cualquier caso, la resistencia al rituximab representa una barrera importante para la inmunoterapia e inmunoquimioterapia de B-NHL en términos de la mejora de los resultados clínicos.

**[0008]** A pesar de que se han analizado las combinaciones de rituximab/quimioterapia, aún existe una necesidad imperiosa y persistente de mejoras adicionales de la terapia. Actualmente se están llevando a cabo dos estrategias generales: a) la obtención por ingeniería genética de nuevos anticuerpos dirigidos contra CD20, y b) la creación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de los linfocitos B distintos de CD20. Actualmente hay dos categorías de nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD20 en evaluación clínica: a) anticuerpos dirigidos contra CD20 que presentan una mayor afinidad que el rituximab por el receptor de la Fc FcγRIIIa (CD16), y b) anticuerpos dirigidos contra CD20 con una menor inmunogenicidad (humanizados; Tb11). El anticuerpo presumiblemente más potente entre éstos, el GA-101, un anticuerpo humanizado dirigido contra CD20 con una fracción Fc manipulada genéticamente con glicoproteínas y una región bisagra en codo modificada produce un incremento de 10-100 veces en la ADCC contra líneas celulares NHL. Pequeños estudios en fase I/II con anticuerpos dirigidos contra CD20 que tienen una menor inmunogenicidad presentan unas tasas de respuesta del orden del 50% en pacientes con B-NHL en recidiva (Coiffier, 2006; Hagenbeek, 2005; Morschhauser, 2005). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de superficie distintas de CD20 en B-NHL como lumilixumab (anti-CD23), epratuzumab (anti-CD22), SGN-40 y HCD122 (ambos anti-CD40), galiximab (anti-CD80), apolizumab (Hu1D10), KRN848, 1D09C3 (todos anti-HLA-DR), han demostrado ser prometedores en los primeros ensayos clínicos. Los nuevos anticuerpos dirigidos contra CD20 y los anticuerpos dirigidos contra los epítomos no CD20 de los linfocitos B tendrán que demostrar una eficacia significativamente superior sobre el rituximab para que se los considere un éxito, no obstante, los primeros resultados clínicos con la mayoría de estos anticuerpos indican sólo beneficios adicionales.

**[0009]** Se han realizado esfuerzos para combinar el rituximab con IL-2 sin conjugar (Eisenbeis y col., 2004; Gluck y col., 2004). Sin embargo, los resultados de un reciente ensayo en fase II indican que "la terapia de combinación con rituximab más rIL-2 es segura y, en general se tolera bien, pero las respuestas fueron bajas" (Khan y col., 2006, Clin Cancer Res 2006; 12 (23): 7046-7053). Además, se encontró que "el rIL-2 expande *in vivo* subgrupos celulares que portan FcR y mejora la ADCC del rituximab *in vitro*". Sin embargo, los autores de estos hallazgos llegaron a la conclusión de que "no se traducen directamente en beneficios clínicos significativos para los pacientes con NHL refractario al rituximab". Por otra parte, los autores concluyeron que "es probable que se requiera una mejor comprensión del mecanismo de acción del rituximab *in vivo* antes de que se puedan conseguir avances adicionales en la modulación favorable de su actividad antitumoral".

**[0010]** Además de las indicaciones para el cáncer, se están desarrollando anticuerpos dirigidos contra linfocitos B,

y el rituximab en particular, para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y anemia hemolítica autoinmunitaria. (Assous y col., 2008).

5 **[0011]** Teniendo en cuenta las terapias estándar, así como las nuevas opciones de tratamiento actualmente en desarrollo clínico, todavía hay una gran necesidad médica en cuanto al diseño de tratamientos más activos para pacientes con linfoma de células B, que preferentemente dan lugar a remisiones completas y/o son útiles para tratar linfoma resistente al rituximab. También existe una imperiosa necesidad médica de proporcionar nuevos medicamentos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, en particular enfermedades autoinmunitarias crónicas.

10

Tabla 1: Anticuerpos dirigidos contra CD20

Nombre del anticuerpo	Tipo	ADCC	CDC (citotoxicidad dependiente del complemento)	Efectos directos	Referencia
rituximab	IgG1 quimérica	++	++	+	Cragg y col.
Ocrelizumab	IgG1 humanizada	+++	+/-	+	Vugmeyster y col.
PRO131921	Ocrelizumab manipulado genéticamente	++++	++	+	
Veltuzumab	IgG1 humanizada	++	++	+	Stein y col.
Ofatumumab	IgG1 humanizada	++	++++	+	Hagenbeck y col.
AME-133	IgG1 humanizada	++++	++	++	Weiner y col.
GA-101	IgG1 humanizada	++++ +	-	++++	Umana y col.

Tabla 2: Selección de anticuerpos dirigidos contra linfocitos B en ensayos clínicos con pacientes que padecen linfoma no Hodgkin

15

Nombre del anticuerpo	Tipo	DLT	Tasa de respuesta objetiva (% , entidad del NHL)/datos clínicos	Referencia
Rituximab	IgG1 quimérica	Ninguno	48, FL en recidiva	McLaughlin y otros
Epratuzumab (anti-CD22)	IgG1 humanizada	Ninguno	43, FL en recidiva	Leonard y col. (a)
Epratuzumab + rituximab	Combinación	Ninguno	67, FL en recidiva	Leonard y col. (b)
Lumiliximab (anti-CD23)		Ninguno	Activo en CLL cuando se combina con quimioterapia	
Galiximab (anti-CD80)	IgG1 humanizada	Ninguno	11, FL en recidiva	Czuczman y col.
Galiximab + rituximab	Combinación	Ninguno	66, FL en recidiva	Leonard y col. (c)
SGN-40, (anti-CD40)	IgG1 humanizada	Liberación de citoquinas	0	Advani y col.
HCD122 (anti-CD40)		En marcha	Fase I en curso	
Calicheamicina anti-CD22 (CMC-544)	IgG1 humanizada	Trombocitopenia	69, FL en recidiva	Fayad y col
BL22 (anti-CD22 acoplado a la exotoxina de pseudomonas)		Síndrome urémico hemolítico	Respuestas en leucemia de células pilosas	

20 **[0012]** El extra-dominio B (EDB) de la fibronectina es uno de los marcadores mejor caracterizado de la angiogénesis descritos hasta ahora (Zardi y col., Embo J. 1987; 6: 2337-2342; Kaspar y col., Int J Cancer. 2006; 118: 1331-1339). Este dominio de homología de tipo III de 91 aminoácidos se puede insertar en la molécula de fibronectina durante la remodelación del tejido activo mediante un mecanismo de procesamiento alternativo (Zardi y col., supra). El EDB es esencialmente indetectable en tejidos adultos sanos pero muy abundante en la vasculatura

de muchos tumores sólidos agresivos. La capacidad de direccionamiento a los tumores del anticuerpo humano de alta afinidad L19 (Pini y col., J Biol Chem. 1998; 273: 21769-21776), específico de EDB, está perfectamente establecida tanto en modelos animales de cáncer (Tarlí y col., Blood. 1999; 94: 192-198; Borsi y col., Int J Cancer. 2002; 102: 75-85; Berndorff y col., J Nucl Med. 2006; 47: 1707-1716; Berndorff y col., Clin Cancer Res. 2005; 11: 5 7053s-7063s; Demartis y col., Eur J Nucl Med. 2001; 28: 534-53) como en pacientes con tumores sólidos (Santimaria y col., Clin Cancer Res. 2003; 9: 571-579). Recientemente, también se ha encontrado la expresión de ED-B en la mayoría de muestras de tejido infiltradas con linfoma procedentes de diversos pacientes con linfoma no Hodgkin (Sauer y col., 2006).

10 **[0013]** Basándose en los conocimientos actuales relativos a las terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos, en particular cuando se combinan con rIL-2 o citoquinas similares, fue sorprendente encontrar en experimentos de terapia de combinación en ratones que la adición de L19-IL2 al rituximab mejoró drásticamente la eficacia de la inmunoterapia dirigida contra CD20 e indujo remisiones completas de larga duración de linfomas de linfocitos B establecidos en el 70% de los casos, mientras que dosis de IL-2 recombinante sin conjugar incluso a dosis tres  
15 veces superiores en combinación con rituximab sólo retrasó el crecimiento tumoral (L19-IL2<sub>dosis baja</sub> vs. IL-2<sub>dosis elevada</sub>: P < 0,001).

**[0014]** Por tanto, en una forma de realización, la invención se refiere a una combinación que comprende al menos:

20 (i) una proteína de fusión que comprende un anticuerpo -la parte que reconoce específicamente el EDb- fibronectina y una parte de la interleuquina 2 y  
(ii) una molécula que se une a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos.

**[0015]** En una forma de realización preferida, la molécula que se une a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o  
25 sus homólogos cancerosos se une específicamente a CD20, CD23, CD22, CD40, CD80, HLA-DR o Hu1D10.

**[0016]** En una forma de realización preferida, la molécula que se une a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos se selecciona entre un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o el mimético de un anticuerpo.

30

**[0017]** Se prefiere una molécula que se una específicamente a CD20, CD23, CD22, CD40, o CD80 que sea un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo, o una de sus proteínas de fusión.

**[0018]** En una forma de realización particularmente preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o una de  
35 sus proteínas de fusión se une específicamente a CD20.

**[0019]** En una forma de realización, la invención se refiere a una combinación que comprende al menos

(i) una proteína de fusión que comprende un anticuerpo -la parte que reconoce específicamente el EDb- fibronectina  
40 y una parte de la interleuquina 2 y  
(ii) una molécula que se une específicamente a CD20.

**[0020]** En una forma de realización adicional, la invención se refiere a una combinación que comprende al menos

45 (i) una proteína de fusión que comprende un anticuerpo -la parte que reconoce específicamente el EDb- fibronectina y una parte de la interleuquina 2 y  
(ii) una molécula que se une específicamente a células que expresan CD20.

**[0021]** En una forma de realización particularmente preferida, la molécula que se une específicamente a células  
50 que expresan CD20 y/o que se une específicamente a CD20 es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD20.

**[0022]** En una forma de realización preferida, la parte del anticuerpo de (i) se une específicamente al dominio EDb de la fibronectina (FN). Dichos anticuerpos se conocen de la técnica anterior y se describen, por ejemplo, en el  
55 documento WO 97/45544.

**[0023]** En otra forma de realización, el anticuerpo que reconoce específicamente el EDb de la fibronectina se une a un epítipo críptico. Un ejemplo de dicho anticuerpo es el anticuerpo BC-1.

**[0024]** Preferentemente, dicho anticuerpo que se une al dominio EDb de la fibronectina presenta una elevada afinidad por el dominio EDb- de la FN, en particular, el anticuerpo se une al dominio EDb de la fibronectina con afinidad nanomolar o subnanomolar. Dichos anticuerpos se conocen de la técnica anterior y se describen, por ejemplo, en el documento WO 99/58570.

5

**[0025]** En particular se prefiere el anticuerpo L19.

**[0026]** La parte del anticuerpo que reconoce específicamente el EDb de la fibronectina, en particular el anticuerpo L19, se puede emplear en anticuerpos de diversos formatos. Los formatos de anticuerpo preferidos son los formatos de IgG completas, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpo, minicuerpo o inmunoproteínas pequeñas (SIP). Se prefieren especialmente los formatos de IgG completas, scFv y SIP para el anticuerpo L19. El más preferido es el anticuerpo L19 en formato scFv. De la técnica anterior se conocen diversos formatos de inmunoproteínas, por ejemplo, basados en el dominio CH3 o el dominio  $\epsilon_{S2}$ -CH4 de la IgE. El formato SIP preferido para L19 basado en el dominio  $\epsilon_{S2}$ -CH4 de la IgE y el L19 en el formato de IgG completa se describen, por ejemplo, en el documento WO 03/076469.

10

15

**[0027]** En una forma de realización preferida adicional, la parte del anticuerpo contiene al menos una secuencia CDR del anticuerpo L19.

**[0028]** En una forma de realización especialmente preferida, la parte del anticuerpo comprende las secuencias CDR del anticuerpo L19, en particular comprende las secuencias según las SEQ ID NO 6 a 11.

20

**[0029]** En una forma de realización preferida adicional, la parte del anticuerpo comprende la cadena VL y VH del anticuerpo L19. En una forma de realización preferida comprende al menos una cadena VH según la SEQ ID NO 1 y al menos una cadena VL según la SEQ ID NO 2. En una forma de realización especialmente preferida, comprende al menos una cadena VH según la SEQ ID NO 1 y al menos una cadena VL según la SEQ ID NO 2.

25

**[0030]** En una forma de realización preferida adicional, la parte del anticuerpo comprende la cadena VH según la SEQ ID NO 1 y la cadena VL según la SEQ ID NO 2. En una forma de realización preferida adicional, la parte del anticuerpo comprende dos cadenas VH según la SEQ ID NO 1 y dos cadenas VL según la SEQ ID NO 2.

30

**[0031]** En una forma de realización preferida adicional, las cadenas VH y VL están conectadas por un segmento de unión de anticuerpos.

**[0032]** En una forma de realización preferida, el segmento de unión de anticuerpos comprende una secuencia según la SEQ ID NO 3, o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia según la SEQ ID NO 3.

35

**[0033]** La parte del anticuerpo que se une específicamente al EDb de la fibronectina está fusionada a la interleuquina 2. Ambas partes pueden estar fusionadas directamente, o se pueden fusionar a través de un segmento de unión, en particular mediante un segmento de unión de proteínas de fusión peptídico. Preferentemente, el segmento de unión de proteínas de fusión tiene una longitud de 1 a 30 aminoácidos. En una forma de realización particularmente preferida, el segmento de unión de proteínas de fusión comprende una secuencia según la SEQ ID NO 5.

40

**[0034]** En otra forma de realización particularmente preferida, la interleuquina 2 es la interleuquina 2 humana (IL2 humana).

45

**[0035]** La interleuquina 2 se puede producir de manera recombinante o se puede aislar a partir de tejido humano, y preferentemente se produce de manera recombinante. En una forma de realización especialmente preferida, la parte de la interleuquina 2 comprende una secuencia según la SEQ ID NO 4, o una de sus variantes funcionales.

50

**[0036]** La proteína de fusión puede ser monomérica, o multimérica, por ejemplo, dimérica. Las formas diméricas u otras formas multiméricas se pueden formar covalente o no covalentemente. Por ejemplo, el L19(scFv)-IL2 puede formar homodímeros no covalentes.

55

**[0037]** Las proteínas de fusión se producen preferentemente de manera recombinante usando procedimientos conocidos por la persona experta. En particular, se pueden utilizar sistemas de expresión procariotas o eucariotas, por ejemplo, sistemas de expresión de levaduras o de mamíferos.

**[0038]** La combinación de la presente invención comprende adicionalmente una molécula que se une a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos.

**[0039]** En una forma de realización de la presente invención, la molécula que se une a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos está marcada, en particular marcada radiactivamente. Preferentemente, el marcaje es un marcaje covalente.

**[0040]** En una forma de realización especialmente preferida, la molécula marcada que se une a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos, es un anticuerpo dirigido contra CD20 marcado radiactivamente.

**[0041]** En medicina se utilizan diversos marcadores radiactivos.

**[0042]** Isótopos radiactivos particularmente útiles para el marcaje de anticuerpos y proteínas son  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{131}\text{I}$ . En una forma de realización especialmente preferida, el anticuerpo dirigido contra CD20 está marcado con  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{131}\text{I}$ .

**[0043]** En una forma de realización particularmente preferida, el anticuerpo dirigido contra CD20 marcado radiactivamente se selecciona entre Y-90-Ibritumomab-Tiuxetan (Y90-Zevalin<sup>®</sup> o -Zevalin<sup>®</sup>) y I-131 tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>). El Y-90-Ibritumomab-Tiuxetan y su producción se describe por ejemplo en el documento EP 0 669 836 como Y2B8 (2B8-MX-DTPA marcado con Itrio-[90]).

**[0044]** En una forma de realización preferida, la combinación de la presente invención comprende adicionalmente una molécula que se une específicamente a CD20. En una forma de realización especialmente preferida, esta molécula es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o una de sus proteínas de fusión.

**[0045]** Particularmente se prefieren anticuerpos dirigidos contra CD20 que presentan actividad ADCC.

**[0046]** En una forma de realización preferida adicional, el anticuerpo dirigido contra CD20 se selecciona entre rituximab, Ocrelizumab, PRO131921, Veltuzumab, Ofatumumab, AME-133, y GA-101.

**[0047]** En una forma de realización preferida de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente a CD20 están en formato de IgG completa, Fab, (Fab)<sub>2</sub>, scFv, diacuerpo, minicuerpo o inmunoproteínas pequeñas (SIP).

**[0048]** Además, el anticuerpo dirigido contra CD20 puede ser monomérico o multimérico, por ejemplo, dimérico. Los anticuerpos multiméricos pueden ser homoméricos o heteroméricos. Por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo bivalente, en el que una parte se une específicamente a CD20 y la otra parte se une a otra diana. Además, la molécula que se une específicamente a CD20 puede comprender efectores adicionales, en particular puede estar marcada radiactivamente. En esta forma de realización de la presente invención se puede utilizar Zevalin<sup>®</sup> o Bexxar<sup>®</sup> como se ha descrito anteriormente.

**[0049]** Un anticuerpo dirigido contra CD20 particularmente preferido es el rituximab, en particular Rituxar<sup>®</sup> (también llamado MabThera<sup>®</sup> o IDEGC2B8). El Rituxan<sup>®</sup> es un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/humano manipulado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B normales y malignos. El anticuerpo es una inmunoglobulina IgG1k que contiene secuencias de las regiones variables murinas de la cadena pesada y ligera y secuencias de la región constante humana. El rituximab se describe, por ejemplo, en los documentos de EE.UU. 5.843.439; 5.776.456 y 5.736.137.

**[0050]** En una forma de realización más preferida, la combinación comprende rituximab y el L19-IL2.

**[0051]** En una forma de realización aún más preferida, el anticuerpo L19 está en formato scFv.

**[0052]** Se prefiere particularmente el L19-IL2 como se describe en Camemolla y col., Blood. 2002; 99: 1659-1665.

**[0053]** Otra forma de realización de la presente invención se refiere a una combinación como se ha descrito anteriormente, para uso como medicamento.

**[0054]** Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a una combinación como se ha descrito anteriormente, para su uso como medicamento para el tratamiento del cáncer.

**[0055]** En una forma de realización preferida, el cáncer es un linfoma, preferentemente un linfoma de células B. Lo más preferido es el uso de la combinación de la presente invención para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de linfocitos B (B-NHL).

5 **[0056]** En una forma de realización preferida adicional, el linfoma de células B es un linfoma de células B refractario o en recidiva o un linfoma resistente a monoterapia con rituximab.

**[0057]** En el presente documento se describe un procedimiento para el tratamiento del cáncer, en el que se administra una combinación de la presente invención a un paciente con cáncer en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferentemente, el cáncer es un linfoma, preferentemente un linfoma de células B, en particular un NHL.

10 **[0058]** Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a una combinación como se ha descrito anteriormente, para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, en particular enfermedades autoinmunitarias crónicas.

15 **[0059]** En una forma de realización preferida, la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o anemia hemolítica autoinmunitaria.

**[0060]** El paciente puede ser un mamífero, y preferentemente el paciente es un ser humano.

20 **[0061]** Son posibles diversas vías de administración, por ejemplo, administración por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal, en la que se prefiere la administración por vía intravenosa.

**[0062]** Además, la proteína de fusión que reconoce específicamente el EDb de la fibronectina y la molécula que se une a los linfocitos B, a los progenitores de los linfocitos B y/o a sus homólogos cancerosos se pueden administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes. Adicionalmente, la combinación se puede administrar una vez o varias veces a un paciente. También es posible que un componente de la combinación se administre una vez, y el otro componente se administre varias veces.

30 **[0063]** Normalmente, si el rituximab y el L19-IL2 se administran en forma de terapia de combinación, se pueden administrar a un paciente a la vez, puesto que esto permite calendarios de administración más sencillos. Por ejemplo, el rituximab y el L19-IL2 se pueden administrar juntos por vía intravenosa una o dos veces al día en intervalos de tiempo que abarcan desde pocos días hasta 3 meses. Además, son posibles una o más rondas de tratamiento.

35 **[0064]** Adicionalmente, la cantidad administrada puede variar. Por ejemplo, el rituximab se puede administrar en una cantidad de 20 a 500 mg/m<sup>2</sup> aproximadamente, preferentemente en una cantidad de 100 a 400 mg/m<sup>2</sup> aproximadamente, y en particular de 375 mg/m<sup>2</sup> aproximadamente de rituximab por administración. Normalmente, el rituximab se administra el Día 1 de un calendario de tratamiento de 2, 3, ó 4 semanas con hasta 6-8 ciclos de tratamiento (inducción de la remisión), aunque son posibles otros calendarios de administración.

45 **[0065]** Las formulaciones terapéuticas de los agentes activos usados de acuerdo con la presente invención se prepara para su almacenamiento mezclando un agente activo que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16h edition, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas.

**[0066]** Ejemplos de formulaciones de anticuerpos dirigidos contra CD20 se describen en el documento WO 98/56418. Esta publicación describe una formulación líquida multidosis que comprende 40 mg/ml de rituximab, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, el 0,9% de alcohol bencílico, y el 0,02% de polisorbato 20 a pH 5,0 que tiene una vida útil mínima de dos años de almacenamiento a 2-8°C. Otra formulación de interés dirigida contra CD20 comprende 10 mg/ml de rituximab en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de citrato sódico dihidratado, 0,7 mg/ml de polisorbato 80, y agua estéril para inyección, a pH 6,5. Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración por vía subcutánea se describen en el documento WO 97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado hasta una alta concentración de proteínas y la formulación reconstituida se puede

55 **[0067]** Además, la cantidad de la proteína de fusión a administrar puede variar. Normalmente, la cantidad de L19-IL2 a administrar por administración es de 1 a  $10 \times 10^6$  UI/m<sup>2</sup> aproximadamente, en particular de 5 a  $50 \times 10^6$  UI/m<sup>2</sup> aproximadamente, especialmente de 10 a  $30 \times 10^6$  UI/m<sup>2</sup> aproximadamente.



**[0068]** También es posible que la cantidad administrada varíe a lo largo del tiempo; por ejemplo, la cantidad de rituximab y/o L19-IL2 se puede aumentar o reducir para una o más rondas de administración.

**[0069]** Además, a la fase del tratamiento de combinación le puede seguir un tratamiento de mantenimiento, en particular con rituximab o L19-IL2.

**[0070]** También es posible ayudar con L19-IL2 al tratamiento con terapias de combinación que contienen anticuerpos contra el B-NHL, en particular, regímenes quimioinmunoterapéuticos (por ejemplo, R-CHOP).

10 **[0071]** El segmento de unión de anticuerpos es cualquier segmento de unión, preferentemente un segmento de unión peptídico, que sea adecuado para la unión de los dominios Vh y V1. Segmentos de unión adecuados se describen, por ejemplo, en Bird y col., Science, 242, 423-426, 1988; Huston y col. PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988. Documentos EP 0573551; EP 0623679 y EP 0318554.

15 **[0072]** Los segmentos de unión de proteínas de fusión son segmentos de unión adecuados para la unión de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo y una segunda proteína biológicamente activa, preferentemente el anticuerpo es peptídico. Enlazadores adecuados se describen en los documentos EP 0573551; EP 0623679 y EP 0318554. En particular, se describen segmentos de unión adecuados en el documento EP 0623679.

20 **[0073]** "Que se une específicamente" o "que reconoce específicamente" como se usa en el presente documento se refiere a la unión a la diana correspondiente. Normalmente, la molécula de unión, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o mimético del anticuerpo se une con una afinidad de al menos  $1 \times 10^{-7}$  M aproximadamente, preferentemente de al menos  $1 \times 10^{-9}$  M aproximadamente, y se une a la diana predeterminada con una afinidad que es al menos dos veces superior a su afinidad para la unión a una diana no específica (por ejemplo, BSA, caseína)  
25 diferente de la diana predeterminada o de una diana estrechamente relacionada.

**[0074]** "Anticuerpo" como se usa en el presente documento engloba anticuerpos de longitud completa, que comprende anticuerpos nativos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y  
30 anticuerpos de IgG completa, así como fragmentos de anticuerpos.

**[0075]** El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una fracción de un anticuerpo de longitud completa, en el que se mantiene una región variable o una capacidad funcional, a saber, la unión específica a la diana. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, un fragmento de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv y  
35 scFv-Fc, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, formatos de inmunoproteínas pequeñas, un anticuerpo de cadena sencilla, un minicuerpo, un diacuerpo formado a partir de fragmentos de anticuerpos, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos normalmente son más pequeños que los anticuerpos completos. Así, las farmacocinéticas son diferentes y algunos fragmentos de anticuerpos sólo constan de una cadena polipeptídica, que hacen su producción más sencilla. No obstante, dichas proteínas de  
40 fusión que comprenden fragmentos de anticuerpo a menudo adolecen de una estabilidad reducida. Preferentemente, el fragmento de anticuerpo está en formato de scFv, (scFv)<sub>2</sub>, o de inmunoproteína pequeña. El formato de inmunoproteína pequeña puede ser un formato basado en un dominio CH3 (por ejemplo, descrito en el documento US 5.837.821) o un dominio ε<sub>2</sub>CH4 de la IgE humana (por ejemplo, descrito en el documento WO 031076469).

45 **[0076]** El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; esto es, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por mutaciones naturales que puedan estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un único determinante antigénico, también denominado epítipo. El modificador "monoclonal" es indicativo de una población de anticuerpos sustancialmente  
50 homogénea dirigida contra un epítipo idéntico y no se debe interpretar como la necesidad de producir el anticuerpo por algún procedimiento particular. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier técnica o metodología conocida en la materia; por ejemplo, el método del hibridoma descrito por primera vez por Koehler y col., 1975, Nature 256: 495, o los métodos del ADN recombinante conocidos en la materia (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.816.567). En otro ejemplo, los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir  
55 de librerías de anticuerpos fágicos, usando técnicas descritas en Clackson y col., 1991, Nature 352: 624-628, y Marks y col., 1991. J. Mol. Biol. 222: 581-597.

**[0077]** En contraste, los anticuerpos de una preparación de anticuerpos policlonales normalmente son una población heterogénea de isotipos y/o clases de inmunoglobulinas y también presentan una variedad de

especificidad de epítipo.

**[0078]** El término anticuerpo "quimérico" como se usa en el presente documento es un tipo de anticuerpo monoclonal en el que una fracción de la secuencia o la secuencia completa de aminoácidos de una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, homóloga, o una variante de la secuencia correspondientes a un anticuerpo monoclonal de otra especie o que pertenece a otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia consenso.

**[0079]** Ciertos tipos de fragmentos de anticuerpo se pueden generar mediante tratamiento enzimático de un anticuerpo de longitud completa. La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígenos idénticos denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígenos, y un fragmento "Fc" residual, denominado así por su capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de unión a antígenos y que aún es capaz de producir la unión cruzada con el antígeno.

**[0080]** Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de unos pocos restos adicionales en el C-término del dominio CH1, que incluyen una o más cisteínas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el resto(s) cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> son pares de fragmentos Fab' unidos por restos cisteína en la región bisagra. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

**[0081]** "Fv" es un fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a un antígeno que consta de un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en asociación fuerte y no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno.

**[0082]** Un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" es una variante de Fv de cadena sencilla que comprende los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que los dominios están presentes en una única cadena polipeptídica y que es capaz de reconocer y de unirse al antígeno. El polipéptido scFv opcionalmente contiene un segmento de unión polipeptídico situado entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme una estructura tridimensional deseada para la unión al antígeno (véase, por ejemplo, Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315).

**[0083]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos que tienen dos sitios de unión a antígenos. Cada fragmento contiene un dominio variable de la cadena pesada (VH) concatenado a un dominio variable de la cadena ligera (VL). Con el uso de un segmento de unión que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, los dominios VH-VL unidos se ven forzados a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena, generando dos sitios de unión a antígenos.

**[0084]** Los diacuerpos se describen con mayor profundidad, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., 1993, Proc. Nat. Acad. Sc. USA 90: 6444-6448.

**[0085]** Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado incluye una variante de una secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina, o uno de sus fragmentos, que sea capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una o más regiones marco (FR) sustancialmente con la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR sustancialmente con la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Esta secuencia de aminoácidos no humana se denomina en el presente documento secuencia "importada", que normalmente se obtiene de un dominio de un anticuerpo "importado", particularmente un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye al menos las CDR o HVL de un anticuerpo no humano, insertado entre las FR de un dominio variable de la cadena pesada o ligera humana.

**[0086]** Los "anticuerpos nativos" se definen en el presente documento como glicoproteínas heterotetraméricas, normalmente de 150.000 Daltons aproximadamente, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada por un enlace disulfuro para formar un heterodímero. El heterodímero está formado por una unión disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de dichos heterodímeros. A pesar de que las cadenas ligera y pesada están unidas por

un enlace disulfuro, el número de uniones disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de la inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también presenta puentes disulfuro intracatenarios con una separación regular. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH) en el amino-término, seguido de tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3, y CH4), así como una región bisagra entre CH1 y CH2. Cada cadena ligera presenta dos dominios, un dominio variable (VL) amino-terminal y un dominio constante (CL) carboxi-terminal. El dominio VL se asocia no covalentemente con el dominio VH, mientras que el dominio CL normalmente está unido de manera covalente al dominio CH1 a través de un enlace disulfuro. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada (Chothia y col., 1985, J Mol. Biol. 186: 651-663). El término "hipervariable" se refiere al hecho de que ciertas secuencias dentro de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y contienen restos que están directamente involucrados en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR) o bucles hipervariables (HVL). Las CDR se definen mediante comparación de secuencias en Kabat y col., 1991, en: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., mientras que los HVL se definen estructuralmente según la estructura tridimensional del dominio variable, como describen Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917.

**[0087]** Aunque estos dos procedimientos producen identificaciones de una CDR ligeramente diferentes, se prefiere la definición estructural. Tal y como define Kabat, la CDR-L1 está situada aproximadamente en los restos 24-34, la CDR-L2, está situada aproximadamente en los restos 50-56, y la CDR-L3, está situada aproximadamente en los restos 89-97 en el dominio variable de la cadena ligera; la CDR-H1 está situada aproximadamente en los restos 31-35, la CDR-H2 está situada aproximadamente en los restos 50-65, y la CDR-H3 está situada aproximadamente en los restos 95-102 en el dominio variable de la cadena pesada.

**[0088]** El término "marcador" se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente al anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable.

**[0089]** A pesar de que las fibronectinas (FN) son el producto de un único gen FN, la proteína resultante puede existir en múltiples formas que -aparte de modificaciones post-traduccionales- surgen del procesamiento alternativo de su transcrito de ARN primario. Este polimorfismo que da lugar a hasta 20 isoformas diferentes de la FN, generando así FN de solubidades, propiedades de adhesión a la célula y de unión al ligando diferentes, le proporciona a la célula la posibilidad de modificar la composición de la matriz extracelular (ECM) de una manera específica de tejido. El procesamiento alternativo tiene lugar en tres regiones del transcrito de ARN primario: el tratamiento u omisión del exón da lugar a la inclusión u omisión de dos repeticiones de tipo III, el extra-dominio B (EDB, también llamado EIIIB o EDII), que se inserta entre las repeticiones FN de tipo de III, III7 y III8, y/o el extra-dominio A (EDA, también llamado EIIIA o EDI), insertado entre las repeticiones FN de tipo de III, III11 y III12. Este tipo de procesamiento se produce en muchos vertebrados, incluyendo Xenopus, pollo, rata, perros y seres humanos.

**[0090]** El "dominio ED-B" se debe entender como el extra-dominio B de la fibronectina humana. A menudo se denomina EDB, EIIIB o EDII.

**[0091]** Se entiende por "miméticos de anticuerpos" a moléculas de unión basadas en estructuras proteicas ("armazones") que se unen específicamente a la diana y que son distintos de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Dichos armazones están descritos en Binz y col., 2005, Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268. Los miméticos de anticuerpos que se unen específicamente al ED-B de la fibronectina están descritos en Grabulovski y col., J. Biol. Chem., 2007, 282: 3196-3204.

**[0092]** Interleuquina 2 según la presente invención se refiere a la interleuquina 2 de mamífero, preferentemente a la interleuquina 2 humana y sus variantes funcionales. Las variantes funcionales de la interleuquina 2 son variantes de la interleuquina 2 humana que presentan al menos el 10%, pero más preferentemente por encima de 50%, e incluso más preferentemente por encima del 90% de la actividad de la interleuquina 2 humana nativa. Las actividades de la interleuquina 2 son actividades de la interleuquina 2 en ensayos biológicos o *in vivo*, en particular la actividad de la interleuquina 2 se puede medir por su efecto sobre la proliferación y/o diferenciación de linfocitos T y B activados o de células asesinas naturales y/o la inducción de la actividad de linfocitos T citotóxicos y/o de la actividad antitumoral de las NK/asesinas activadas por linfoquinas (LAK). (Meazza R, Marciano S, Sforzini S, y col. Analysis of IL-2 receptor expression and of the biological effects of IL-2 gene transfection in small-cell lung cancer.

Br.J.Cancer. 1996; 74: 788-795). En particular, las variantes funcionales son las muteínas de la interleuquina 2 en la cisteína 125 como se describe en el documento EP 0109748 y otras proteínas, incluyendo muteínas de cisteínas como se describe en el documento EP136489, en particular la interleuquina 2 de la serina en 125. Además, se puede alterar el N-término de las variantes hIL-2 sin afectar significativamente a su actividad, en particular los 1-5 aminoácidos N-terminales, y especialmente se puede eliminar o alterar, preferentemente eliminar, la alanina N-terminal. Además, la interleuquina 2 puede contener modificaciones post-traduccionales alteradas o eliminadas, en particular el patrón de glicosilación puede estar alterado o carecer de él. Se pueden obtener diferentes glicosilaciones o se pueden eliminar, por ejemplo, mutando la secuencia o con la expresión de la proteína de fusión en un hospedador adecuado. Por ejemplo, la Aldesleuquina, que ha sido aprobada para el RCC metastásico, es una interleuquina 2 humana desglucosilada con una serina en 125 y sin alanina en posición 1 producida en *E. coli*.

### Leyenda de las Figuras

**[0093]** Figura 1. Inmunohistoquímica con el anticuerpo L19 que revela la expresión de EDB en xenoinjertos de linfoma de células B. La tinción inmunohistoquímica usando el anticuerpo L19, específico para el EDB de la fibronectina, reveló una potente expresión de esta isoforma de la fibronectina con un patrón de tinción vascular prominente en xenoinjertos de linfoma de Ramos (panel de izquierda). La tinción es similar al patrón de tinción de L19 en tumores sólidos, como se puede observar en el ejemplo con el xenoinjerto de glioblastoma U87 (panel de la derecha). Para el control negativo, se omitió la utilización de anticuerpo primario. Barras de escala, 100  $\mu$ m.

**[0094]** Figura 2. Experimentos de localización *in vivo*: inmunofluorescencia *ex vivo* (A) y estudios de biodistribución cuantitativa (B). El comportamiento del direccionamiento *in vivo* del anticuerpo L19 se sometió ensayo en el modelo de SCID/linfoma de Ramos. (A) Ratones portadores de linfoma fueron inyectados con L19-SIP, marcado químicamente con el fluoróforo Cy3. La figura muestra una imagen microscópica de fluorescencia bicolor de una sección de linfoma 24 horas después de la inyección, que confirma la localización del anticuerpo (rojo) sobre estructuras vasculares del tumor. Se ha aplicado un anticuerpo dirigido contra CD31 *ex vivo* para perfilar las células endoteliales y se detectó con un anticuerpo dirigido contra IgG de rata Alexa Fluor 488 (verde). Barras de escala, 100  $\mu$ m. (B) Se obtuvieron los resultados de la biodistribución cuantitativa 24 horas y 48 horas después de la inyección de L19-SIP radiomarcado con  $^{125}$ I en animales portadores de linfoma ( $n \geq 3$  para cada punto temporal). Los resultados del direccionamiento medio se expresa como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g  $\pm$  SD). Cuarenta y ocho horas después de la inyección, se pudo observar una acumulación y retención selectivas del anticuerpo en el tejido de linfoma, con relaciones del tumor a sangre de 4,8 y relaciones de tumor a órganos en el intervalo de 3,8 a 17,3.

**[0095]** Figura 3. El efecto del L19-SIP como agente único, IL-2 sin conjugar y rituximab sobre el crecimiento de linfoma. Ratones SCID portadores de xenoinjertos de linfoma de Ramos establecidos subcutáneamente fueron inyectados por vía intravenosa con la proteína de fusión L19-IL2 dirigida al tejido vascular ( $\blacksquare$ ; 20  $\mu$ g), la dosis correspondiente de rIL-2 sin dirigir ( $\blacktriangle$ ; 6,6  $\mu$ g), rituximab ( $\bullet$ ; 200  $\mu$ g), o disolución salina control ( $\times$ ) los días 8, 11, 14, y 17 después de la implantación de las células tumorales. El L19-IL2 como agente único y el rituximab como agente único retrasaron significativamente el crecimiento del tumor ( $P = 0,024$  y  $P = 0,004$ , respectivamente). En contraste, el rIL-2 sin conjugar no mostró una actividad terapéutica significativa ( $P = 0,383$ ), lo que indica la contribución de la administración dirigida de IL-2 al efecto terapéutico (L19-IL2 vs. IL-2:  $P = 0,044$ ).

**[0096]** Figura 4. Efecto terapéutico de L19-IL2 e IL-2 sin conjugar en combinación con rituximab. Ratones SCID portadores de xenoinjertos de linfoma establecidos subcutáneamente fueron inyectados por vía intravenosa con disolución salina (X), 200  $\mu$ g de rituximab + IL-2 sin conjugar a dosis baja (A; 2,2  $\mu$ g), 200  $\mu$ g de rituximab + IL-2 sin conjugar a dosis elevada ( $\blacktriangle$ ; 6,6  $\mu$ g), 200  $\mu$ g de rituximab + L19-IL2 a dosis baja ( $\square$ ; 6,6  $\mu$ g, correspondientes a 2,2  $\mu$ g de IL-2), o 200  $\mu$ g de rituximab + L19-IL2 a dosis elevada ( $\blacksquare$ ; 20  $\mu$ g, correspondientes a 6,6  $\mu$ g de IL-2) los días 8, 11, 14 y 17. El L19-IL2 en combinación con el rituximab fue muy eficaz, induciendo remisiones completas en 4 de 5 ratones en el grupo de dosis bajas, así como en el grupo L19-IL2 de dosis elevadas. En contraste, el rIL-2 sin conjugar en combinación con el rituximab no indujo regresiones tumorales y todos los tumores continuaron creciendo. Todos los ratones con CR se mantuvieron libres del tumor durante un período de al menos 42 días.

**[0097]** Figura 5. El efecto terapéutico de L19-IL2, IL-2 y el rituximab en monoterapia y en terapias de combinación en el modelo de linfoma diseminado. Ratones SCID ( $n \geq 6$ ) fueron inyectados por vía intravenosa con  $2 \times 10^5$  células de linfoma de Ramos y se trataron 8 días más tarde según los siguientes regímenes: IL-2 sin dirigir (6,6  $\mu$ g), L19-IL2 (20  $\mu$ g), rituximab (200  $\mu$ g), rituximab (200  $\mu$ g) + IL-2 (6,6  $\mu$ g), rituximab (200  $\mu$ g) + L19-IL2 (20  $\mu$ g), o una disolución salina control. El L19-IL2 en combinación con el rituximab fue muy eficaz, lo que da lugar a la supervivencia de todos los ratones durante 41 días. Por el contrario, todos los ratones tratados con el rIL-2 sin conjugar en combinación con

el rituximab habían muerto después de 41 días.

**[0098]** Figura 6. Validación de las dianas en muestras de linfoma humano. Se ha encontrado que el EDB se expresa en estructuras neovasculares de cuerpos de linfoma de células B humanos, incluyendo los subtipos 5 frecuentes de linfoma de células B grandes y difusas y linfoma de Burkitt. Barras de escala, 100  $\mu$ m.

## Ejemplos

### Materiales y procedimientos

10

#### *Animales y líneas celulares*

**[0099]** Se obtuvieron ratones SCID CB17/lcr hembra de seis a ocho semanas de edad de Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Todos los ratones se alojaron en unidades de microaislamiento y se les 15 proporcionó comida estéril y agua a voluntad durante los estudios. Se adquirió la línea celular Ramos44 de linfoma de células B humanos EBV-negativa en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células se mantuvieron en crecimiento en fase logarítmica en medio RPMI 1640 ajustado para contener L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, 4,5 g/l de glucosa, 1,5 g/l de bicarbonato, 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina.

20

#### *Anticuerpos y reactivos*

**[0100]** El L19 es un anticuerpo de direccionamiento a tejidos vasculares dirigido contra el dominio EDB de la fibronectina. La expresión, purificación y caracterización de L19 en formato SIP (inmunoproteínas pequeñas) y la 25 proteína de fusión L19-IL2 han sido descritas anteriormente en Borsi y col. (Int J Cancer 2002; 102: 75-85) y Camemolla y col. (Blood. 2002, 99: 1659-1665). La IL-2 recombinante humana (Proleukin, 18 x 10<sup>6</sup> UI) se obtuvo de Prorero Pharma (Liestal, Suiza) y el anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico humano dirigido contra CD20, rituximab (MabThera) de Roche (Reinach, Suiza).

30 *Inmunohistoquímica*

**[0101]** Para la inmunohistoquímica en tumores de xenoinjertos de Ramos, se fijaron secciones criostáticas de 10  $\mu$ m de muestras congeladas en acetona enfriada con hielo, se rehidrató en TBS (50 mmol/l de Tris, 100 mmol/l de NaCl a pH 7,4), y se bloquearon con el 20% de FCS (Invitrogen, Basilea, Suiza). El L19-SIP se añadió a las 35 secciones a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml. El anticuerpo primario unido se detectó con anticuerpo IgE de conejo dirigido contra humano (Dako, Glostrup, Dinamarca), seguido de anticuerpo biotinilado IgG de cabra dirigido contra conejo (Biospa, Milán, Italia) y el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina (Biospa). Se utilizó Fast Red TRSalt (Sigma) como sustrato de la fosfatasa. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se montaron con el medio de montaje Glycergel (Dako) y se analizaron con un microscopio Axiovert S 100 TV (Zeiss, Feldbach, Suiza). 40 La inmunohistoquímica sobre muestras de linfoma humano se llevó a cabo en forma de xenoinjertos de linfoma, pero sin embargo se utilizó L19-SIP biotinilado como anticuerpo primario y se detectó con el complejo de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Biospa).

#### *Experimentos de fluorescencia ex vivo*

45

**[0102]** El L19-SIP se marcó con el éster Cy3-NHS, un compuesto fluorescente de cianina, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Pharmacia, Dübendorf, Suiza). Se inyectaron 120  $\mu$ m del conjugado L19-Cy3 por vía intravenosa (iv) en la vena lateral de la cola de ratones portadores de linfoma. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la inyección, y los tumores se extirparon, se embebieron en compuesto de 50 crioembido (Microm, Walldorf, Alemania) y se almacenaron a -80°C. Se cortaron secciones de 10  $\mu$ m, se secaron a 37°C durante 15 minutos y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó anticuerpo de rata dirigido contra CD31 (BD Pharmingen) para perfilar las células endoteliales usando el anticuerpo Alexa Fluor 488 de conejo dirigido contra IgG de rata como anticuerpo secundario (Invitrogen). Las imágenes se capturaron en un microscopio Axioskop 2 Mot plus equipado con una cámara AxioCam MRC (Zeiss).

55

#### *Biodistribución cuantitativa*

**[0103]** Para evaluar el comportamiento del direccionamiento *in vivo*, se llevaron a cabo análisis de biodistribución cuantitativos como se ha descrito anteriormente<sup>8</sup>. Resumiendo, L19-SIP purificado se marcó radiactivamente con <sup>125</sup>I

y se inyectó por vía intravenosa en ratones SCID portadores de xenoinjertos de linfoma de Ramos implantados subcutáneamente (sc). Los ratones se sacrificaron 24 ó 48 horas después de la inyección (xx µg, yy µCi por ratón), y se utilizaron tres animales para cada punto de tiempo. Los órganos se pesaron y se midió la radiactividad utilizando un contador Cobra γ (Packard, Meriden, CT). El contenido en radiactividad de órganos representativos se expresó como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% DI/g ± SD).

#### *Modelo de xenoinjerto de linfoma localizado*

**[0104]** 1 x 10<sup>7</sup> células de linfoma Ramos se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de ratones SCID CB17/lcr hembra de 6 a 8 semanas de edad el día 0. Cuando los tumores estuvieron establecidos y fueron claramente palpables (50 - 100 mm<sup>3</sup>, 8 días después de la inyección), los ratones se distribuyeron para maximizar la uniformidad entre los grupos y se les inyectó en la vena lateral de la cola 20 µg de L19-IL2 (correspondientes a 6,6 µg o 118000 UI de rIL-2), 6,6 µg de rIL-2 sin dirigir, 200 µg de rituximab, o disolución salina control en un volumen de 100 µg los días 8, 11, 14 y 17 (Q3Dx4). Para los estudios de terapia de combinación, se administró L19-IL2 (6,6 y 20 µg, correspondientes a 2,2 y 6,6 µg de rIL-2 "libre", respectivamente), o rIL-2 sin conjugar (2,2 y 6,6 µg) en combinación con rituximab (200 µg) mediante inyecciones intravenosas por separado los días 8, 11, 14 y 17.

**[0105]** Los ratones se controlaron diariamente y se midió el crecimiento tumoral al menos 3 veces por semana con un calibre digital usando la siguiente fórmula: volumen = longitud x anchura<sup>2</sup> x 0,5. Las respuestas se definieron como remisión completa (CR, sin tumor visible) o remisión parcial (PR, una reducción del volumen del tumor de al menos el 50%). Los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un volumen > 2000 mm<sup>3</sup> o los animales mostraron signos de enfermedad. Todos los experimentos con animales se realizaron bajo la licencia del proyecto "Direccionamiento de tumores" expedido a D.N. Por el Kantonalen Veterinäramt des Kantons Zurich (Bewilligung 198/2005).

#### *Modelo de xenoinjerto de linfoma diseminado*

**[0106]** Para modelar la enfermedad sistémica, ratones SCID se inyectaron iv con 2 x 10<sup>6</sup> células de linfoma de Ramos resuspendidas en 200 µl de PBS. Se dejó que se produjera la diseminación y el crecimiento de linfoma de células B durante 8 días antes del inicio de la terapia. Los ratones se dividieron al azar en 6 grupos (n ≥ 6) y se les inyectó por vía intravenosa con 20 µg de L19-IL2, 6,6 µg de rIL-2 sin conjugar, o 200 µg de rituximab (monoterapias) o 200 µg de rituximab en combinación con 20 µg de L19-IL2, 200 µg de rituximab en combinación con 6,6 µg de IL-2 sin conjugar (terapias de combinación), o disolución salina los días 8, 11, 14 y 17 (Q3Dx4). Los ratones se controlaron diariamente para la presencia de parálisis en las patas traseras o signos de deterioro de las condiciones, en cuyo caso los ratones fueron sacrificados. El inicio de la parálisis o la muerte se establecieron como criterios de valoración y se registró la supervivencia de los ratones para el análisis de la eficacia terapéutica. Los experimentos con animales usando el modelo de linfoma diseminado se realizaron según la enmienda 1 a la licencia del proyecto "Direccionamiento de tumores".

#### *40 Análisis estadístico*

**[0107]** Los datos se expresan como media ± error estándar. Las diferencias en el volumen del tumor entre los diferentes grupos de ratones se compararon utilizando la prueba *t* de Student de dos colas. Se representaron las curvas de supervivencia Kaplan-Meier para mostrar la eficacia terapéutica en el modelo de linfoma diseminado y se llevaron a cabo comparaciones con la prueba de log-rank. Valores de P de dos colas <0,05 se consideran significativos.

### **Resultados**

#### *50 Localización in vitro: inmunohistoquímica sobre tumores xenoinjertados*

**[0108]** Se han realizado análisis inmunohistoquímicos sobre secciones de xenoinjertos de linfoma de Ramos usando anticuerpo L19 específico para el dominio EDB de la fibronectina. Tal y como se demuestra en la Figura 1 (panel de la izquierda), para L19 se pudo observar una tinción específica de las estructuras vasculares en el tejido de linfoma, una reminiscencia de su patrón de tinción en tumores sólidos, como muestra el ejemplo con un xenoinjerto de glioblastoma U87 humano (panel de la derecha). El patrón de expresión de EDB en xenoinjertos de linfoma indica que esta isoforma puede servir como diana para la introducción selectiva en el sitio de linfoma de compuestos bioactivos *in vivo*.

*Comportamiento del direccionamiento in vivo: fluorescencia ex vivo y biodistribución cuantitativa*

- [0109]** En la siguiente etapa se investigó si el EDB de la fibronectina expresado en xenoinjertos de linfoma es accesible para el anticuerpo L19 desde el torrente sanguíneo *in vivo*. Para este fin, ratones portadores de tumores subcutáneos de linfoma de Ramos se inyectaron intravenosamente con L19-SIP, marcado químicamente con el fluoróforo Cy3. Después de 24 horas, los animales se sacrificaron y las secciones tumorales se procesaron como se describe en Materiales y procedimientos. La Figura 2a muestra una imagen microscópica de fluorescencia bicolor de una sección de linfoma, que confirma la localización del anticuerpo sobre estructuras vasculares del tumor.
- 10 **[0110]** Con el fin de evaluar cuantitativamente la deposición del anticuerpo, ratones portadores de xenoinjertos de linfoma de Ramos implantados subcutáneamente se inyectaron por vía intravenosa con preparaciones radioyodadas de L19-SIP. Como se representa en la Figura 2b, L19 presentaba una acumulación en el tejido de linfoma con valores absolutos de captación del tumor del 4,7% DI/g 24 horas después de la inyección, pero relaciones de tumor a sangre tan solo moderadas del orden de 2 en este punto temporal (relaciones de tumor a órgano en el intervalo de
- 15 2,7 a 7,1). No obstante, después de 48 horas, el anticuerpo se eliminó de los órganos normales más rápidamente, lo que resulta en un incremento de las relaciones de tumor a sangre (4,8) y tumor a órgano (hasta 17,3) y demuestra una acumulación y retención específicas del anticuerpo en el sitio del tumor.

*Actividad terapéutica del agente único L19-IL2 y del agente único rituximab en el modelo de linfoma localizado*

- 20 **[0111]** Previamente se ha demostrado que la proteína de fusión de anticuerpo-citoquina L19-IL2 presentaba una potente actividad anticancerígena en diversos modelos de tumores sólidos (Menrad y col. (Expert Opin Ther Targets. 2005; 9: 491-500), Carnemolla y col. (Blood. 2002; 99: 1659-1665)). Para evaluar la eficacia monoterapéutica de L19-IL2 en linfoma de células B, ratones SCID se inyectaron subcutáneamente con  $1 \times 10^7$  células de Ramos. Ocho
- 25 días después de la implantación de las células tumorales, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de 50 - 100 mm<sup>3</sup>, los ratones (n  $\geq$ 4) se trataron por vía intravenosa con 20  $\mu$ g de L19-IL2 (correspondientes a 6,6  $\mu$ g de rIL-2), 6,6  $\mu$ g de rIL-2 sin conjugar, 200  $\mu$ g de rituximab, o solución salina (Q3Dx4). La Figura 3 demuestra que el agente único L19-IL2 y el agente único rituximab inhibieron sustancialmente el crecimiento del linfoma en comparación con los ratones control tratados con solución salina (P = 0,024 y P = 0,004, respectivamente). En contraste, cantidades
- 30 equimolares de rIL-2 sin conjugar no presentaron ningún efecto terapéutico significativo (P = 0,383), similar a lo que se ha publicado previamente para modelos animales de cánceres sólidos y que demuestra la contribución al efecto terapéutico del direccionamiento vascular de la citoquina mediado por anticuerpos (L19-IL2 vs. IL-2: P = 0,044). Sin embargo, tanto L19-IL2 como el rituximab sólo retrasaron el crecimiento tumoral cuando se utilizaron como monoterapia y todos los animales padecieron la progresión de la enfermedad en este experimento.
- 35 **[0112]** Para proporcionar información sobre la toxicidad asociada al tratamiento, el peso de los animales se midió al menos 3 veces por semana. No se observaron evidencias de toxicidad, puesto que ninguno de los ratones en los grupos de terapia perdió más del 3% del peso corporal durante el periodo de estudio.

*Actividad terapéutica de L19-IL2 y el rituximab en combinación con el modelo de linfoma localizado*

- [0113]** Se han publicado una variedad de formas para mejorar la eficacia clínica del rituximab, incluyendo la administración de rIL-2 para potenciar la muerte mediada por la ADCC de las células de linfoma (Cartron y col., Blood. 2004; 104: 2635-2642). Así, nos preguntamos si una combinación de IL-2 dirigida contra el tejido vascular y
- 45 terapia contra CD20 sería terapéuticamente más eficaz que cualquier aproximación terapéutica en solitario y, en particular, si la acumulación de IL-2 mediada por anticuerpos en el tejido de linfoma superaría la eficacia de una combinación de la citoquina sin conjugar y el rituximab. Para este fin, se llevó a cabo un experimento de terapia de combinación según el siguiente esquema ( $\geq$ 5 ratones por grupo): 200  $\mu$ g de rituximab + 2,2  $\mu$ g de rIL-2 sin conjugar ("dosis baja"), 200  $\mu$ g de rituximab + 6,6  $\mu$ g de rIL-2 sin conjugar ("dosis alta"), 200  $\mu$ g de rituximab + 6,6  $\mu$ g de L19-
- 50 IL2 ("dosis baja", correspondientes a 2,2  $\mu$ g de rIL-2), 200  $\mu$ g de rituximab + 20  $\mu$ g de L19-IL2 ("dosis alta", correspondientes a 6,6  $\mu$ g de rIL-2), o solución salina control. Por analogía con el experimento de monoterapia, las inyecciones se iniciaron 8 días después de la inoculación de las células tumorales cuando se hubieron desarrollado xenoinjertos subcutáneos palpables y se repitieron cada tres días para un total de 4 inyecciones.
- 55 **[0114]** Como se muestra en la Figura 4, el rituximab en combinación con rIL-2 sin conjugar provocó un retraso significativo en el crecimiento tumoral comparado con los controles (rIL-2<sub>dosis baja y elevada</sub> vs. solución salina: P < 0,001). El rIL-2 a dosis elevadas era ligeramente más eficaz incrementando la eficacia del rituximab que el rIL-2 a dosis bajas (P = 0,038), no obstante, no se han observado regresiones tumorales y todos los tumores continuaron creciendo. En contraste, la combinación de rituximab con la proteína de fusión L19-IL2 presentaba una actividad

anti-linfoma sorprendentemente superior e indujo erradicaciones completas de linfomas de Ramos establecidos en 4 de 5 ratones en el grupo de L19-IL2 a dosis elevada (L19-IL2<sub>dosis elevada</sub> vs. solución salina:  $P < 0,00001$ ), habiéndose conseguido ya 3 de 4 CR (remisiones completas) después de 3 inyecciones. De hecho, la inmunocitoquímica era notablemente más potente que la cantidad equimolar correspondiente de rIL-2 sin conjugar en combinación con el rituximab (L19-IL2<sub>dosis elevada</sub> vs. rIL-2<sub>dosis elevada</sub>:  $P < 0,001$ ). De manera notable, incluso el L19-IL2 a su nivel de dosificación más bajo combinado con el rituximab aún presentaba una actividad terapéutica excelente (L19-IL2<sub>dosis baja</sub> vs. solución salina:  $P < 0,00001$ ; L19-IL2<sub>dosis baja</sub> vs. rIL-2<sub>dosis baja</sub>:  $P < 0,00001$ ), induciendo CRs en 4 de 5 casos después de 4 ciclos de terapia, mientras que incluso una dosis tres veces superior de la citoquina no dirigida combinada con el rituximab sólo fue capaz de retrasar el crecimiento tumoral (L19-IL2<sub>dosis baja</sub> vs. rIL-2<sub>dosis elevada</sub>:  $P < 0,001$ ). Siete de las 8 CRs en los dos grupos tratados con L19-IL2 fueron duraderas y los ratones permanecieron libres de tumores durante un periodo de observación de al menos 42 días. Un ratón con CR procedente del grupo L19-IL2 a dosis baja recayó a los 27 días después de un período de remisión de 21 días. Dos ratones (uno procedente del grupo L19-IL2 a dosis baja y otro del grupo a dosis elevada) no alcanzaron una CR pero sí una buena PR después de 4 ciclos de terapia. Es importante destacar que el rendimiento terapéutico de la terapia de combinación no lleva asociado una toxicidad adicional. Los ratones no presentaron una pérdida de peso corporal significativa en ningún punto temporal durante el tratamiento ( $< 3\%$ ), lo que indica que los regímenes de terapia de combinación también se toleraron bien.

#### *Actividad terapéutica en el modelo de linfoma diseminado*

**[0115]** Además, en el modelo de linfoma diseminado como se describe en la leyenda de la Figura 5, la terapia de combinación con la proteína de fusión de anticuerpo dirigido contra EDB-IL2, L19-IL2, y el anticuerpo dirigido contra CD20-rituximab dio lugar a la supervivencia de todos los ratones durante todo el periodo de observación de 41 días, mientras que todos los ratones tratados con una combinación de rIL-2 sin conjugar y Rituxan<sup>®</sup> sólo produjeron el retraso del crecimiento tumoral. Todos los ratones se sacrificaron al final del periodo de observación de 42 días.

#### *Validación de la expresión dirigida en muestras de linfoma humano*

**[0116]** Por último, el análisis inmunohistoquímico confirmó la presencia y el patrón de expresión vascular del EDB de la fibronectina en tumores malignos de linfocitos B humanos, incluyendo linfomas de células B grandes y difusas y linfomas de Burkitt (Figura 6).

#### Referencias:

**[0117]**

Coiffier B, Lepage E, Briere J, y col. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with rituximab alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 235-242.

Marcus R, Imrie K, Belch A, y col. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005; 105: 1417-1423.

Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, y col. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2005; 106: 3725-3732.

Coiffier B. Treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a look over the past decade. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006; 7: S7-13.

Gordan LN, Grow WB, Pusateri A, y col. Phase II trial of individualized rituximab dosing for patients with CD20-positive lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1096-1102.

Hoehster HS, Weller E, Gascoyne R, y col. Maintenance rituximab after CVP results in superior clinical outcome in advanced follicular lymphoma (FL): results of the E1496 Phase III Trial from the Eastern Cooperative Oncology Group and the Cancer and Leukemia Group B (abstract). *Blood* 2005; 106: No 349.

Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, y col. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3121-3127.



- Cragg MS, Gleannie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagent. *Blood* 2004; 103: 2738-2743.
- Vugmeyster Y, Beyer J, Howell K, y col. Depletion of B cells by a humanized anti CD20 antibody PRO70769 in 5 *Macaca fascicularis*. *J Immunother* 2005; 28: 212-219.
- Stein R, Qu Z, Chen S, y col. Characterization of a new humanized anti-CD20, IMMU-106, and its use in combination with the humanized abti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2868-2878.
- 10 Hagenbeek A, Plesner T, Johnson P y col. HuMax-CD20, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody: results of a phase I/II trial in relapsed or refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma (abstract). *Blood* 2005; 106: 4760a.
- 15 Weiner GJ, Bowles JA, Link BK, y col. Anti-CD20 monoclonal antibody (mAb) with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab (abstract). *Blood* 2005; 106: 348a.
- Umana P, Mossner E, Brueckner P, y col. Novel 3rd generation humanized type II CD20 antibody with glycoengineered Fc and modified elbow hinge for enhanced ADCC and superior apoptosis induction (abstract). *Blood* 2006; 108: 229a.
- 20 McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK y col. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-2833.
- 25 Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, y col. Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3051-3059.
- Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, y col. Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed 30 of refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5044-5051.
- Leonard JP, Friedberg J, Younes A, y col. A phase I/II study of galiximab (an anti-CD80 monoclonal antibody) in combination with rituximab for relapsed or refractory follicular lymphoma. *Ann Oncol* 2007; 18: 1216-1223.
- 35 Fayad L, Patel H, Verhoef G y col., Clinical activity of the immunoconjugate CMC-544 in B-cell malignancies: preliminary report of the expanded maximum tolerated dose (MTD) cohort of phase 1 study (abstract). *Blood* 2006; 108: 2711a.
- Czuczman MS, THall A, Witzig TE, y col. Phase I/II study of galiximab, an anti-CD80 monoclonal antibody, for 40 relapsed or refractory, follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4390-4398.
- Advani R, Forero-Torres A, Furmann RR, y col. SGN-40 (anti-huCD40 mAb) monotherapy induces durable objective responses in patients with relapsed aggressive non-Hodgkins's lymphoma: evidence of antitumor activity from a phase I study (abstract) *Blood* 2006; 108: 695a.
- 45 Sauer S, Hoffmann J, Menrad A, Dürkop H, Menssen HD. Expression of ED-B Fibronectin in Tissues from Human Hematologic Malignancies (abstract) *Blood* 2006; 108.
- Assous N, Gossec L, Dieude P y col. Rituximab therapy in rheumatoid arthritis in daily practice. *J Rheumatol.* 2008; 50 35: 31-4.
- Eisenbeis CF, Grainger A , Fischer B, Baiocchi RA, Carrodegua L, Roychowdhury S, Chen L, Banks AL, Davis T, Young D, Kelbick N, Stephens J, Byrd JC, Grever MR, Caligiuri MA, Porcu P. Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. *Clin. Cancer Res* 2004; 10: 55 6101-6110;
- W. L. Gluck, D. Hurst, A. Yuen, A. M. Levine, M. A. Dayton, J. P. Gockerman, J. Lucas, K. Denis-Mize, B. Tong, D. Navis, y col. Phase I Studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: IL-2 Mediated Natural Killer Cell Expansion Correlations with Clinical Response *Clin. Cancer Res*, 2004; 10: 2253-2264.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0118]

- 5 <110> Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft
- <120> Combinación de una proteína de fusión de un anticuerpo dirigido contra el EDb de la fibronectina-IL-2, y una molécula de unión a los linfocitos B, progenitores de los linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos
- <130> 53379AEP
- <160> 11
- 10 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> vh L19
- <400> 1

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20          25
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90
Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100          105          110
Thr Val Ser Ser
 115

```

- 20 <210> 2
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> VI L19
- <400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro  
 85 90 95  
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 3  
 <211> 12  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Segmento de unión  
 <400> 3  
 10

Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 133  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30  
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45  
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60  
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95  
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110  
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile  
 115 120 125  
 Ile Ser Thr Leu Thr  
 130

<210> 5  
 <211> 17  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Segmento de unión de proteínas de fusión  
 <400> 5

10

Glu Phe Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser  
 1 5 10 15

Gly

<210> 6  
 <211> 5  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> CDR1 vh  
 <400> 6

20

Ser Phe Ser Met Ser  
1 5

<210> 7  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> CDR3 vh  
<400> 7  
10

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 8  
<211> 17  
15 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> CDR2 vh  
<400> 8  
20

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

Gly

<210> 9  
<211> 12  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> CDR1 VI  
<400> 9  
30

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

<210> 10  
<211> 7  
35 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> CDR2 VI  
<400> 10  
40

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> CDR3 VI  
<400> 11

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr  
1 5

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación que comprende al menos
- 5 (i) una proteína de fusión que comprende un anticuerpo -la parte que reconoce específicamente el EDb- fibronectina y una parte de la interleuquina 2 y  
(ii) una molécula de unión a los linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos.
2. Una combinación según la reivindicación 1, en la que la molécula de unión a los linfocitos B,  
10 progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos se une específicamente a CD20, CD23, CD22, CD40, CD80, HLA-DR o HuiD10.
3. Una combinación según la reivindicación 1 ó 2, en la que la molécula que se une específicamente a  
15 CD20, CD23, CD22, CD40 o CD80 es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión de los mismos.
4. Una combinación según la reivindicación 2, en la que la molécula de unión a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos es una molécula que se une específicamente a CD20.
- 20 5. Una combinación según la reivindicación 1, en la que la molécula de unión a linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos es una molécula que se une específicamente a células que expresan CD20.
6. Una combinación según la reivindicación 4 ó 5, en la que la molécula es un anticuerpo o un fragmento  
25 de anticuerpo que se une específicamente a CD20.
7. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la parte del anticuerpo de (i) reconoce el dominio EDb de la fibronectina.
- 30 8. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la proteína de fusión tiene un segmento de unión de proteínas de fusión que conecta la parte del anticuerpo y la parte de la interleuquina 2.
9. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la parte del anticuerpo se une específicamente al dominio oncofetal EDb de la fibronectina con una afinidad sub-nanomolar o nanomolar.  
35
10. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la parte del anticuerpo contiene al menos una secuencia CDR del anticuerpo L19.
11. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la parte del anticuerpo  
40 comprende las secuencias según las SEQ ID NO 6 a 11.
12. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la parte del anticuerpo comprende al menos una cadena pesada V según la SEQ ID NO 1, o al menos una cadena ligera V según la SEQ ID NO 2.  
45
13. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la parte del anticuerpo comprende una cadena pesada V según la SEQ ID NO 1 y una cadena ligera V según la SEQ ID NO 2.
14. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la cadena pesada y la  
50 cadena ligera están conectadas por un segmento de unión de anticuerpos.
15. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que el segmento de unión de anticuerpos comprende una secuencia según la SEQ ID NO 3, o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia según la SEQ ID NO 3.  
55
16. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que la parte de la interleuquina 2 es interleuquina 2 humana o una de sus variantes funcionales.
17. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la parte de la

interleuquina 2 comprende una secuencia según la SEQ ID NO 4.

18. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que un segmento de unión de proteínas de fusión conecta la parte del anticuerpo y la parte de la interleuquina 2.
- 5 19. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el segmento de unión de proteínas de fusión tiene una longitud de 1 a 30 aminoácidos.
20. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que el segmento de unión de proteínas de fusión comprende una secuencia según la SEQ ID NO 5.
- 10 21. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7 a 20, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión del mismo se une específicamente a CD20.
- 15 22. Una combinación según la reivindicación 21, en la que el anticuerpo dirigido contra CD20 presenta actividad ADCC.
23. Una combinación según una de las reivindicaciones 6, 21 y 22, en la que el anticuerpo dirigido contra CD20 se selecciona entre rituximab, Ocrelizumab, PRO131921, Veltuzumab, Ofatumumab, AME-133, y GA-101.
- 20 24. Una combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en la que la molécula de unión a los linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos está marcada, en particular, radiactivamente.
- 25 25. Una combinación según la reivindicación 24, en la que la molécula marcada de unión a los linfocitos B, progenitores de linfocitos B y/o sus homólogos cancerosos es un anticuerpo dirigido contra CD20 marcado radiactivamente.
26. Una combinación según la reivindicación 25, en la que el anticuerpo dirigido contra CD20 marcado radiactivamente, se selecciona entre un anticuerpo dirigido contra CD20 marcado con  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{131}\text{I}$ .
- 30 27. Una combinación según la reivindicación 26, en la que el anticuerpo dirigido contra CD20 marcado radiactivamente se selecciona entre Y-90-Ibritumomab-Tiuxetan (Y90-Zevalin<sup>®</sup>) y I-131 tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>).
- 35 28. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, para su utilización en un procedimiento para el tratamiento del cáncer mediante la administración de la combinación a un paciente con cáncer.
29. Una combinación para su utilización según la reivindicación 28, en la que el cáncer es linfoma.
- 40 30. Una combinación para su utilización según la reivindicación 29, en la que el linfoma es un linfoma de células B, en particular, un linfoma no Hodgkin (NHL).
31. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias mediante la administración de la combinación a un paciente que lo necesite.
- 45 32. Una combinación para su utilización según la reivindicación 31, en la que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona entre artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y anemia hemolítica autoinmunitaria.
- 50



**Figura 1**

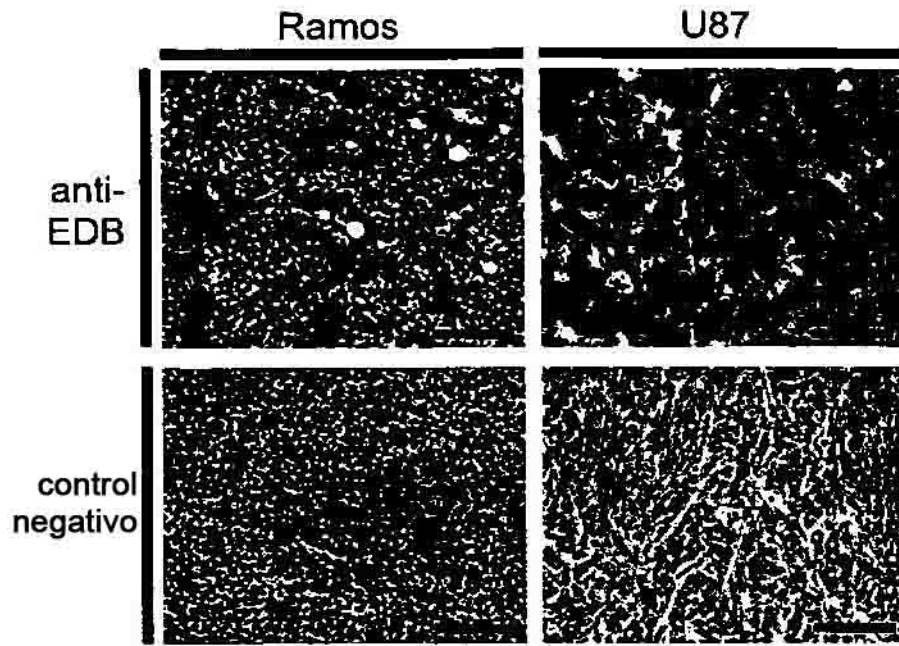


Figura 2

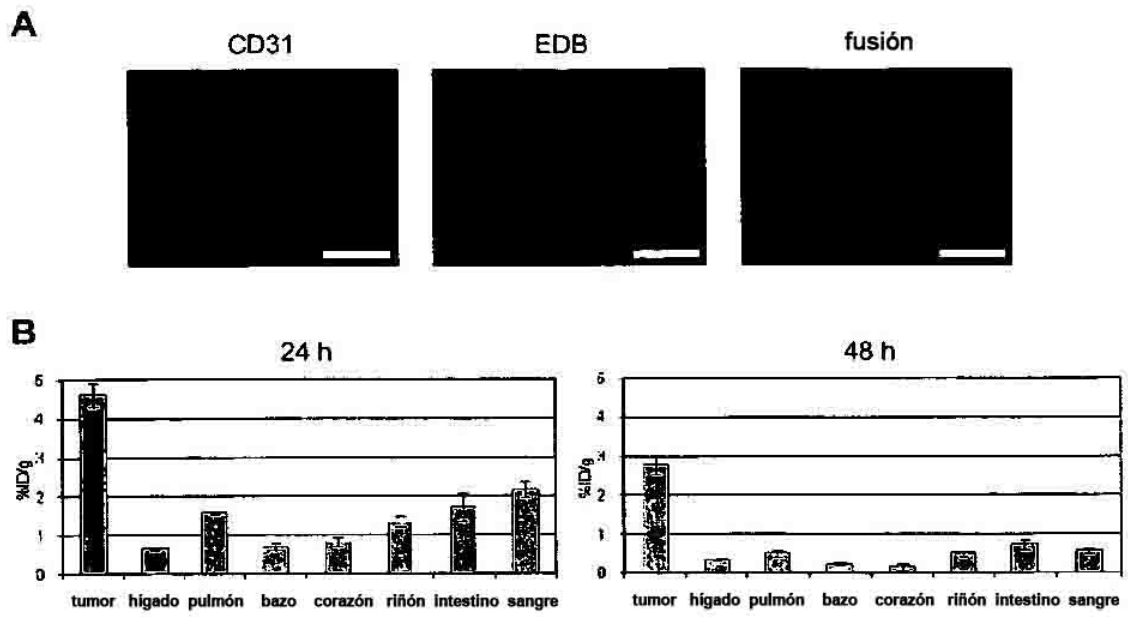


Figura 3

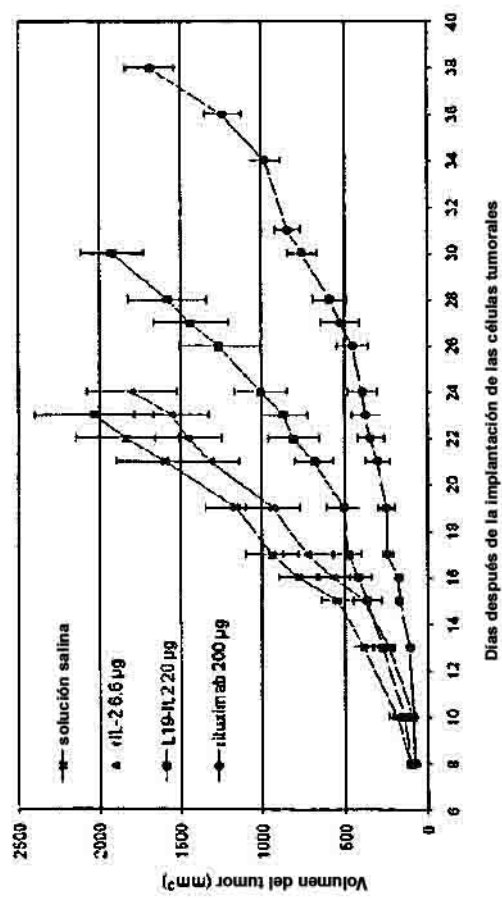


Figura 4

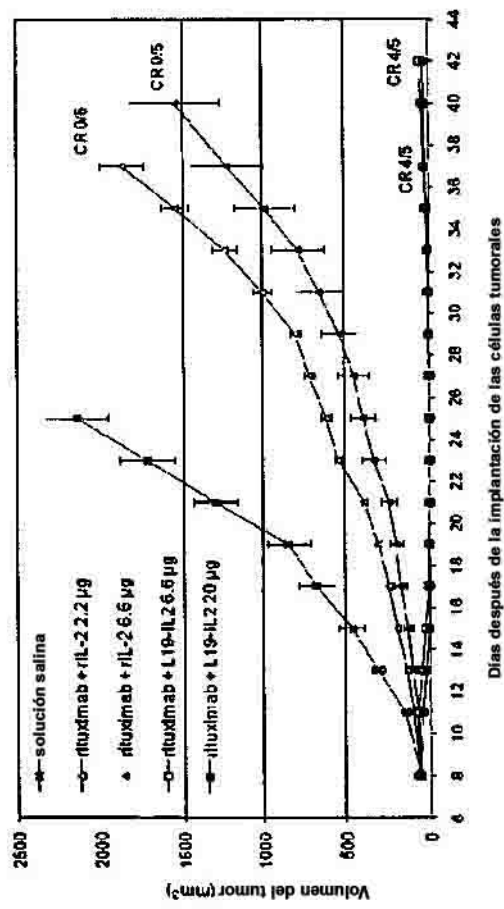
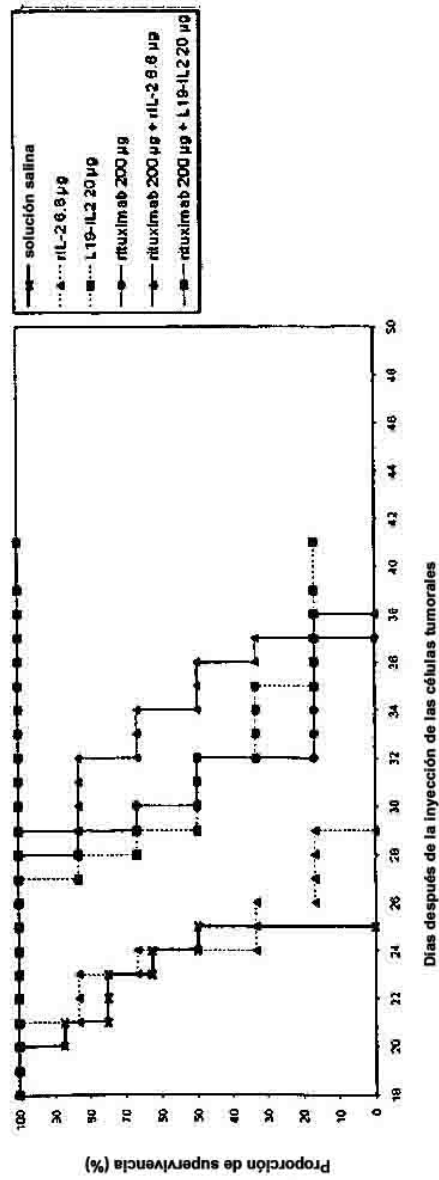
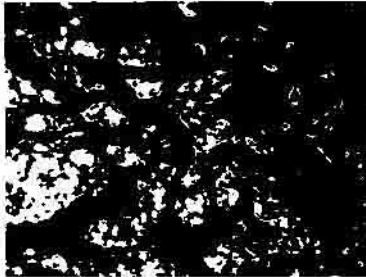


Figura 5

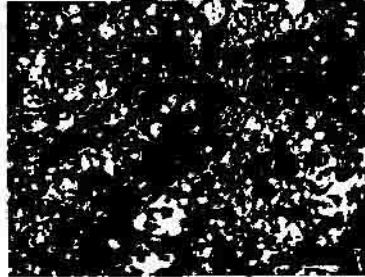


**Figura 6**

Linfoma de células B  
grandes y difusas



Linfoma de células B  
grandes y difusas



Linfoma  
de Burkitt

