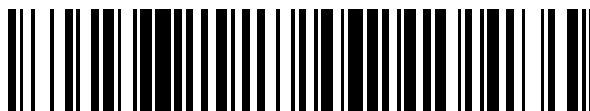


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 193**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/525** (2006.01)

**C07K 14/57** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2003 E 03725526 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 1499730**

54 Título: **Inmunoconjugados para el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

**30.04.2002 GB 0209896**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.02.2014**

73 Titular/es:

**MOLMED SPA (100.0%)  
VIA OLGETTINA 58  
20132 MILAN, IT**

72 Inventor/es:

**CORTI, ANGELO y  
CURNIS, FLAVIO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 441 193 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

Inmunocombinados para el tratamiento de tumores

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica y a los usos de la misma.

**5 Antecedentes de la invención**

La actividad antitumoral de ciertas citocinas es muy conocida y está bien descrita. Ciertas citocinas ya se han usado terapéuticamente en seres humanos. Por ejemplo, las citocinas tales como IL-2 e IFN- $\gamma$  han mostrado una actividad antitumoral positiva en pacientes con diferentes tipos de tumores, tales como carcinoma metastásico de riñón, tricoleucemia, sarcoma de Kaposi, melanoma, mieloma múltiple, y similares. Otras citocinas similares a IFN $\beta$ , el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)  $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-1, 4, 6, 12, 15 y los Factores Estimuladores de Colonias (CFSs) han mostrado cierta actividad antitumoral en ciertos tipos de tumores.

En general, el uso terapéutico de las citocinas está claramente limitado por su toxicidad sistémica. TNF, por ejemplo, se descubrió en un principio por su capacidad de inducir la necrosis hemorrágica de ciertos tumores, y por su efecto citotóxico *in vitro* sobre diferentes líneas tumorales, pero posteriormente se demostró que tenía una actividad pro-inflamatoria intensa que, en caso de condiciones de sobreproducción, puede afectar peligrosamente al cuerpo humano.

Debido a que la toxicidad sistémica es un problema fundamental con el uso de cantidades farmacológicamente activas de citocinas en seres humanos, actualmente se están estudiando nuevos derivados y estrategias terapéuticas, dirigidas a reducir los efectos tóxicos de esta clase de efectores biológicos a la vez que se mantiene su eficacia terapéutica.

Ciertas aproximaciones nuevas se dirigen a:

- a) el desarrollo de proteínas de fusión que pueden transportar TNF al tumor e incrementar la concentración local. Por ejemplo, se han producido proteínas de fusión que consisten en TNF y anticuerpos específicos de tumores;
- b) el desarrollo de mutantes de TNF que mantienen la actividad antitumoral y tienen una toxicidad sistémica reducida. Por lo tanto, ya se han preparado mutantes capaces de reconocer de manera selectiva solamente un receptor;
- c) el uso de anticuerpos anti-TNF capaces de reducir ciertos efectos tóxicos de TNF sin comprometer su actividad antitumoral. Tales anticuerpos ya se han descrito en la bibliografía;
- d) el uso de derivados de TNF con una semivida mayor (por ejemplo, TNF conjugado con polietilén glicol).

Se ha informado recientemente de la preparación de derivados de TNF capaces de seleccionar como objetivo las localizaciones tumorales. Por ejemplo, se ha descrito una proteína de fusión obtenida fusionando el gen de la cadena pesada de un mAb anti-receptor de transferrina y el gen de TNF, o una proteína de fusión de TNF con la región "bisagra" de un anticuerpo monoclonal hacia el antígeno TAG72 asociado a tumores, o una proteína de fusión Fv-TNF.

El documento EP 251 494 describe un sistema para administrar un agente diagnóstico o terapéutico, que comprende: un anticuerpo conjugado con avidina o estreptavidina, un agente capaz de complejar el anticuerpo conjugado y un compuesto que consiste en el agente diagnóstico o terapéutico conjugado con biotina, que se administran de manera secuencial y adecuadamente retrasada, para permitir la localización del agente terapéutico o diagnóstico por medio de la interacción biotina-estreptavidina en la célula objetivo reconocida por el anticuerpo. Los agentes terapéuticos o diagnósticos descritos comprenden quelatos metálicos, en particular quelatos de radionúclidos y agentes antitumorales de peso molecular bajo tales como cis-platino, doxorubicina, etc.

El documento EP 496 074 describe un método que proporciona la administración secuencial de un anticuerpo biotinilado, avidina o estreptavidina y un agente diagnóstico o terapéutico biotinilado. Aunque se mencionan de manera genérica los agentes citotóxicos similares a ricina, se describe principalmente la aplicación relativa a los compuestos radiomarcados.

El documento WO 95/15979 describe un método para localizar agentes sumamente tóxicos en objetivos celulares, basado en la administración de un primer conjugado que comprende la molécula específica del objetivo conjugada con un ligando o un anti-ligando, seguido de la administración de un segundo conjugado que consiste en el agente tóxico unido a un anti-ligando o al ligando.

El documento WO 99/13329 describe un método para dirigir una molécula hacia vasos angiogénicos tumorales, basado en la conjugación de dicha molécula con ligandos de receptores NGR. Se han propuesto varias moléculas

como posibles candidatos, pero solamente se describe de manera específica la doxorubicina. No se describe el uso de ligandos de receptores NGR como vehículos de citocinas para inducir respuestas inmunitarias.

5 En el documento WO01/61017 el presente inventor describe cómo descubrió sorprendentemente que el índice terapéutico de ciertas citocinas se puede mejorar notablemente y que sus propiedades inmunoterapéuticas se pueden potenciar mediante el acoplamiento con un ligando del receptor aminopeptidasa-N (CD13). CD13 es una glicoproteína transmembrana de 150 kDa que está muy conservada en diversas especies. Se expresa en las células normales y también en las líneas tumorales mieloides, en el endotelio angiogénico y en ciertos epitelios. El receptor CD13 se identifica normalmente como el receptor "NGR", ya que sus ligandos peptídicos comparten el motivo de aminoácidos "NGR".

10 No obstante, sigue existiendo la necesidad de composiciones farmacéuticas y métodos adicionales y mejorados para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer.

### Sumario de la invención

15 La administración y penetración de los fármacos en las células neoplásicas es crítica para la eficacia de la quimioterapia de tumores. Se ha descubierto que, sorprendentemente, la administración con selección del objetivo de dosis de picogramos de citocinas aumenta la penetración de los fármacos antineoplásicos. Con más detalle, se ha descubierto que la administración de dosis muy bajas de citocinas en tumores y en el medio asociado al tumor, que incluye la vasculatura tumoral, representa una aproximación nueva para evitar mecanismos de retroinhibición y para conservar su capacidad de alterar las barreras de penetración de fármacos. La presente invención representa así una estrategia nueva y sorprendente para incrementar el índice terapéutico de los fármacos antineoplásicos. En una realización preferida, se ha descubierto mediante el uso de la selección del objetivo vascular llevada a cabo acoplando TNF con CNGRC, un péptido que selecciona como objetivo la neovasculatura tumoral, que este tratamiento aumentó 8-10 veces la eficacia terapéutica de doxorubicina, sin indicios de toxicidad incrementada. De forma similar, la selección del objetivo vascular aumentó la eficacia de melfalano, un fármaco antineoplásico diferente. Se observó sinergia con la quimioterapia con 3-5 ng/kg de TNF (i.p.) con selección del objetivo,  $10^6$  veces menor que la  $DL_{50}$  y  $10^5$  veces menor que la dosis necesaria para TNF sin selección del objetivo. Además, se ha descubierto también que la administración con selección del objetivo de dosis bajas de TNF en los vasos tumorales no induce la liberación de receptores de TNF solubles en la circulación. También se ha descubierto que RGD-TNF e IFN $\gamma$ -NGR son activos en el intervalo de picogramos. También se ha demostrado que NGR-TNF incrementa el efecto del cisplatino. Estos resultados indican que la administración de cantidades mínimas de citocinas en los vasos tumorales representa una aproximación nueva para evitar los mecanismos de retroinhibición y para conservar su capacidad de alterar las barreras de penetración de fármacos. La selección del objetivo vascular de esta manera representa una estrategia nueva para incrementar el índice terapéutico de los fármacos antineoplásicos.

### Declaraciones de la invención

35 Se describe una composición farmacéutica que comprende un conjugado de una citocina y un resto de selección como objetivo de un tumor (TTM) y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que la citocina está presente en una cantidad que no induce un mecanismo de retroinhibición. Así, la citocina está presente en una cantidad que no induce la escisión del receptor soluble de citocina.

40 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer que comprende un conjugado de una citocina y al menos un resto de selección como objetivo de un tumor (TTM) que contiene el motivo NGR o el motivo RGD y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado está presente en una cantidad para proporcionar una dosis en el intervalo de 0,5 a 500 ng/kg, y en el que la citocina es TNF o IFN $\gamma$ .

45 En una realización, el conjugado está presente en una cantidad para proporcionar una dosis en el intervalo de 1 a 50 ng/kg. En otra realización, el conjugado está presente en una cantidad para proporcionar una dosis en el intervalo de 5 a 15 ng/kg.

En una realización, el conjugado está presente en una cantidad de forma que el conjugado, o un metabolito del mismo, se proporciona en el plasma sanguíneo de un paciente a tratar en una cantidad no mayor de alrededor de 35.000 ng/día para un paciente de 70 kg.

En una realización más preferida, la citocina es TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ .

50 En una realización, el TTM es una molécula de unión tal como un ligando de una molécula de la superficie de las células tumorales, tal como un receptor, marcador u otro componente extracelular.

En otra realización, el TTM es un resto de selección como objetivo de la vasculatura tumoral (TVTM), y puede ser una molécula de unión tal como un ligando de una molécula de la superficie celular de la vasculatura tumoral, tal como un receptor, marcador u otro componente extracelular.

55 En otra realización, el TTM es un ligando o fragmento del mismo.

En una realización preferida, el TTM contiene el motivo NGR. En una realización muy preferida, el TTM es CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cicloCVLNGRMEC, CNGRC lineal o cíclico.

En otra realización preferida, el TTM es un péptido que contiene el motivo RGD.

En una realización, el TTM selecciona como objetivo la aminopeptidasa N (CD13), integrina  $\alpha\beta 3$  o integrina  $\alpha\beta 5$ .

- 5 Las combinaciones de restos de selección del objetivo preferidos y citocinas que se pueden usar en la presente invención se muestran en la Tabla siguiente.

Citocina	Resto de Selección del Objetivo
TNF- $\alpha$	PÉPTIDO QUE CONTIENE RGD
TNF- $\beta$	PÉPTIDO QUE CONTIENE RGD
IFN- $\gamma$	PÉPTIDO QUE CONTIENE RGD
TNF- $\alpha$	PÉPTIDO QUE CONTIENE NGR
TNF- $\beta$	PÉPTIDO QUE CONTIENE NGR
IFN- $\gamma$	PÉPTIDO QUE CONTIENE NGR

- 10 En las realizaciones especialmente preferidas, el conjugado comprende TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$  y un péptido que contiene NGR, o TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$  y un péptido que contiene RGD. En una realización preferida, el conjugado está en forma de una proteína de fusión.

En otra realización, el conjugado está en forma de un ácido nucleico.

En otra realización, la composición comprende además otro agente antitumoral o compuesto de formación de imágenes para el diagnóstico de tumores. Preferiblemente, el agente antitumoral adicional es doxorubicina, melfalano o cisplatino.

- 15 En otras palabras, la presente invención proporciona un método para tratar o diagnosticar el cáncer, que comprende administrar a un paciente que lo necesita un conjugado o una composición farmacéutica usada en la presente invención en una cantidad eficaz, en el que dicha cantidad no induce un mecanismo de retroinhibición.

Ciertas ventajas clave de la invención

- 20 Para alcanzar las células cancerosas en tumores sólidos, los fármacos antineoplásicos deben entrar en los vasos sanguíneos tumorales, atravesar la pared de los vasos y finalmente migrar a través del intersticio. La perfusión tumoral heterogénea, la permeabilidad vascular y la densidad de células, y la presión intersticial incrementada podrían representar barreras críticas que pueden limitar la penetración de fármacos en las células neoplásicas distantes de los vasos tumorales y, por lo tanto, la eficacia de la quimioterapia (1). Las estrategias dirigidas a mejorar la penetración de fármacos en los tumores son, por lo tanto, de gran interés experimental y clínico.

- 25 Un conjunto importante de pruebas sugiere que el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (TNF), y una citocina inflamatoria dotada con una actividad anti-tumoral potente, se podrían aprovechar para este propósito. Por ejemplo, la adición de TNF a la perfusión regional de extremidades aisladas con melfalano o doxorubicina ha producido tasas de respuesta más elevadas en pacientes con sarcomas de tejidos blandos o melanomas en extremidades que las obtenidas con fármacos antineoplásicos solos (2-6). Se cree que la alteración inducida por TNF de la función de la barrera endotelial, la reducción de la presión intersticial del tumor, la penetración incrementada de fármacos antineoplásicos y el daño de los vasos tumorales son mecanismos importantes de la sinergia entre TNF y la quimioterapia (3, 4, 7-10). Desafortunadamente, la administración sistémica de TNF va acompañada por una toxicidad inaceptable, la dosis tolerada máxima (8-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) es 10-50 veces menor que la dosis eficaz estimada (11, 12). Por esta razón, se ha abandonado la administración sistémica de TNF, y el uso clínico de esta citocina se limita a tratamientos locorregionales. Sin embargo, ciertas características de la actividad de TNF, en particular la selectividad por los vasos asociados a los tumores y la sinergia con los fármacos antineoplásicos, ha continuado dando esperanzas con respecto a la posibilidad de aplicaciones terapéuticas más amplias (13).

- 40 Los efectos vasculares de TNF proporcionan el fundamento para el desarrollo de una estrategia de "selección del objetivo vascular" dirigida a incrementar la eficacia local y a posibilitar la administración sistémica de dosis terapéuticas. Recientemente se ha demostrado que la administración con selección del objetivo de TNF en los vasos tumorales se puede llevar a cabo acoplado esta proteína con el péptido CNGRC, un ligando de aminopeptidasa N (CD13) que selecciona como objetivo la neovasculatura tumoral (14). En el presente trabajo, se ha investigado si la selección del objetivo vascular con dosis bajas de este conjugado, denominado NGR-TNF, podría aumentar la

penetración de los fármacos antineoplásicos en los tumores y mejorar su eficacia. Se demuestra que la administración sistémica de dosis de picogramos de NGR-TNF (3-5 ng/kg) en ratones, seis órdenes de magnitud menores que la DL<sub>50</sub>, es suficiente para aumentar la actividad anti-tumoral de melfalano y doxorubicina, sin indicios de toxicidad incrementada. Además, se proporcionan pruebas de que la selección del objetivo vascular con NGR-TNF puede reducir las barreras de penetración de fármacos e incrementar la cantidad de doxorubicina que alcanza las células cancerosas. Finalmente, se demuestra que la administración de cantidades mínimas de NGR-TNF en los vasos tumorales supera otros problemas importantes asociados a la administración sistémica de dosis relativamente elevadas de TNF, es decir, la inducción de inhibidores de TNF solubles.

**Descripción detallada**

10 Diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención se describirán a continuación a modo de ejemplo no limitante.

Aunque en general los métodos mencionados en la presente memoria son muy conocidos en la técnica, se puede hacer referencia en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc (así como la versión completa Current Protocols in Molecular Biology).

15

Mecanismos de retroinhibición

Los mecanismos de retroinhibición se conocen en la técnica, y pueden incluir: la escisión del receptor soluble y la inducción de otras citocinas, hormonas o agentes biológicos a nivel sistémico o local, de forma que reducen directamente o indirectamente la actividad de la citocina con selección del objetivo de la presente invención. La inducción de inhibidores solubles o receptores señuelo son ejemplos de inhibidores directos. IL-10, TGF-β u otras citocinas anti-inflamatorias pueden impedir indirectamente la cascada de sucesos desencadenada por las citocinas inflamatorias.

20

Escisión de receptores

Esta expresión se refiere a la capacidad de las células de eliminar mediante escisión el dominio extracelular de un receptor de citocinas y liberarlo en la circulación en forma de un producto soluble. En muchos casos, estos productos de escisión todavía son capaces de unirse a sus ligandos. En contraste, no obstante, la porción restante del receptor unido a la membrana ya no se une a los ligandos, y por lo tanto las células se desensibilizan a la acción de una citocina particular. Tales receptores solubles se han descrito para una diversidad de citocinas, que incluyen IL-4, 6, 6, IGF, TNF-α e IFN-γ.

25

30 Conjugado

La presente invención se refiere a un conjugado que es una molécula que comprende al menos una proteína de selección del objetivo que contiene el motivo NGR o motivo RGD unido a al menos una citocina, formado por medio de fusión genética o acoplamiento químico. "Unido" significa que la primera y segunda secuencias están asociadas de forma que la segunda secuencia es capaz de ser transportada por la primera secuencia a una célula objetivo. Así, los conjugados incluyen las proteínas de fusión en las que la proteína de transporte está unida a una citocina por medio de sus esqueletos polipeptídicos por medio de la expresión genética de una molécula de ADN que codifica estas proteínas, las proteínas sintetizadas directamente y las proteínas acopladas en las que las secuencias preformadas están asociadas mediante un agente de entrecruzamiento. El término se usa también en la presente memoria para incluir las asociaciones, tales como agregados, de la citocina con la proteína de selección del objetivo. Según una realización, la segunda secuencia puede comprender una secuencia polinucleotídica. Esta realización se puede considerar como un complejo proteína/ácido nucleico.

35

La segunda secuencia puede ser de la misma especie que la primera secuencia, pero está presente en el conjugado de la invención de una manera diferente de la situación natural, o de una especie diferente.

40

Los conjugados de la presente invención son capaces de dirigirse a una célula, de forma que puede tener lugar una función efectora que corresponde a la secuencia polipeptídica acoplada a la secuencia de transporte.

45

El péptido se puede acoplar directamente a la citocina o indirectamente por medio de un espaciador, que puede ser un único aminoácido, una secuencia de aminoácidos o un residuo orgánico, tal como 6-aminocapril-N-hidroxisuccinimida.

50

El ligando peptídico se une preferiblemente al extremo N-terminal de la citocina, por lo que se minimiza cualquier interferencia en la unión de la citocina modificada a su receptor. De manera alternativa, el péptido se puede unir a residuos de aminoácidos que son aceptores de enlaces amida o carboxílicos, que se pueden dar de manera natural en la molécula o que se pueden insertar artificialmente mediante el uso de técnicas de ingeniería genética. La citocina modificada se prepara preferiblemente mediante el uso de un cADN que comprende una secuencia contigua a 5' que codifica el péptido.

50

Según una realización preferida, se proporciona un producto de conjugación entre TNF y la secuencia CNGRC en la que el extremo amino-terminal de TNF está unido al péptido CNGRC por medio del espaciador G (glicina).

#### Citocinas

5 La penetración de fármacos en las células neoplásicas es crítica para la eficacia de la quimioterapia de tumores sólidos. Para alcanzar las células cancerosas en tumores sólidos, los fármacos antineoplásicos deben entrar en los vasos sanguíneos tumorales, atravesar la pared de los vasos y finalmente migrar a través del intersticio. La perfusión tumoral heterogénea, la permeabilidad vascular y la densidad de células, y la presión intersticial incrementada pueden representar barreras críticas que pueden limitar la penetración de fármacos en las células neoplásicas y, por lo tanto, la eficacia de la quimioterapia. Las citocinas que tienen el efecto de afectar a estos valores, por lo tanto, son  
10 útiles en la presente invención. Una lista no limitante de citocinas que se pueden usar en la presente invención es: TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , y IFN $\gamma$ .

#### TNF

15 TNF actúa como una citocina inflamatoria y tiene el efecto de inducir la alteración de la función de la barrera endotelial, reducir la presión intersticial tumoral, e incrementar la penetración de fármacos antineoplásicos y el daño de los vasos tumorales.

20 La primera indicación de que existía una molécula necrotizante de tumores se hizo cuando se observó que los pacientes de cáncer mostraban ocasionalmente una regresión espontánea de sus tumores tras las infecciones bacterianas. Los estudios posteriores en la década de 1960 indicaron que los mediadores asociados al hospedador (o endógenos), producidos en respuesta a los productos bacterianos, eran probablemente responsables de los efectos observados. En 1975 se demostró que un factor circulante inducido por las bacterias tenía una actividad anti-tumoral intensa contra los tumores implantados en la piel de ratones. Este factor, denominado factor de necrosis tumoral (TNF), se aisló posteriormente, se clonó, y se descubrió que era el prototipo de una familia de moléculas que están implicadas en la regulación inmunitaria y la inflamación. Los receptores de TNF y los otros miembros de la superfamilia de TNF también constituyen una superfamilia de proteínas relacionadas.

25 Los ligandos relacionados con TNF comparten normalmente varias características comunes. Estas características no incluyen un grado elevado de homología de secuencias de aminoácidos (aa). Con la excepción del factor de crecimiento nervioso (NGF) y TNF-beta, todos los ligandos se sintetizan en forma de proteínas transmembrana de tipo II (extremo C-terminal extracelular) que contienen un segmento citoplasmático corto (10-80 residuos de aa) y una región extracelular relativamente larga (140-215 residuos de aa). NGF, que no está relacionado estructuralmente con TNF, se incluye en esta superfamilia únicamente debido a su capacidad de unirse al receptor de NGF de baja afinidad (LNGFR) TNFRSF. NGF tiene un péptido de secuencia señal clásico y se secreta. TNF- $\beta$ , en contraste, aunque también se secreta completamente, tiene una estructura primaria mucho más relacionada con las proteínas transmembrana de tipo II. TNF- $\beta$  se podría considerar una proteína de tipo II con un segmento transmembrana no funcional o ineficaz. En general, los miembros de TNFSF forman estructuras triméricas, y sus  
30 monómeros están compuestos de cadenas beta que se orientan en una estructura de dos láminas. Como consecuencia de la estructura trimérica de estas moléculas, se propone que los ligandos y receptores de las superfamilias TNSF y TNFRSF experimentan un "agrupamiento" durante la transducción de señales.

35 TNF- $\alpha$ : El TNF- $\alpha$  humano es un polipéptido de 233 residuos de aa, sin glicosilar, que existe en forma de una proteína transmembrana o soluble. Cuando se expresa en forma de una proteína asociada a membrana de 26 kDa, TNF- $\alpha$  consiste en un dominio citoplasmático de 29 residuos de aa, un segmento transmembrana de 28 residuos de aa, y una región extracelular de 176 residuos de aa. La proteína soluble se crea mediante un suceso de escisión proteolítica por medio de una enzima convertora de TNF-alfa (TACE) de 85 kDa, que genera una molécula de 17 kDa, 157 residuos de aa que normalmente circula en forma de un homotrímero.

45 TNF- $\beta$ /LT- $\alpha$ : TNF- $\beta$ , también conocido como linfotóxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), es una molécula cuya clonación fue contemporánea de la de TNF- $\alpha$ . Aunque TNF- $\beta$  circula en forma de un polipéptido glicosilado de 25 kDa, 171 residuos de aa, se ha descubierto una forma mayor que tiene una longitud de 194 residuos de aa. El cADN de TNF- $\beta$  humano codifica un marco de lectura abierto de 205 residuos de aa (202 en ratones), y supuestamente se da cierto tipo de procesamiento proteolítico durante la secreción. Como en el caso de TNF- $\alpha$ , el TNF- $\beta$  circulante existe en forma de un trímero asociado de manera no covalente y se sabe que se une a los mismos receptores que TNF- $\alpha$ .

50 En una realización, el TNF es una forma mutante de TNF capaz de unirse selectivamente a uno de los receptores de TNF (Loetscher H et al (1993) J Biol Chem 268:26350-7; Van Ostade X et al (1993) Nature 361:266-9).

Otras muchas citocinas inflamatorias también tienen la propiedad de incrementar la permeabilidad de los vasos endoteliales.

55 Las citocinas inflamatorias, también conocidas como citocinas pro-inflamatorias, son un miembro de polipéptidos y glicoproteínas con pesos moleculares entre 5 kDa y 70 kDa. Tienen un efecto estimulante sobre la respuesta inflamatoria. Las citocinas inflamatorias más importantes son TNF, IL-1, IL-6 e IL-8.

A continuación se muestra una tabla de algunas citocinas clasificadas como citocinas inflamatorias:

Citocinas inflamatorias

Grupo	Citocinas individuales
Citocinas endógenas	IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6
Estimulación	IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\alpha$ , INF- $\beta$ , quimiocinas
Estimulación de la producción de reactivos de fase aguda	IL-1, IL-6, IL-11, TNF- $\alpha$ INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , LIF, OSM, CNTF
Citocinas quimioatrayentes	
Quimiocinas CXC	IL-8, PF-4, PBP, NAP-2, $\beta$ -TG
Quimiocinas CC	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES
Quimiocinas C	Linfotactina
Estimulación de citocinas inflamatorias	IL-12

5 TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante, LIF: factor inhibidor de leucemia, OSM: oncostatina M; CNTF: factor neurotrófico ciliar, PF-4: factor plaquetario 4; PBP: proteína básica de plaquetas; NAP-2: proteína activadora de neutrófilos 2;  $\beta$ -TG:  $\beta$ -tromboglobulina; MIP: proteína inflamatoria de macrófagos; MCP: proteína quimioatrayente de monocitos.

10 La estimulación de la respuesta inflamatoria se lleva a cabo también mediante IL-11, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , y especialmente mediante los miembros de la superfamilia de quimiocinas. TGF- $\beta$  en ciertas situaciones tiene varias actividades inflamatorias, que incluyen efectos quimioatrayentes sobre neutrófilos, linfocitos T y monocitos inactivados.

Resto de selección del objetivo

15 Se ha descubierto que el índice terapéutico de las citocinas se puede incrementar dirigiendo la selección del objetivo de la citocina hacia los vasos tumorales. Además, debido a que se sabe que las células tumorales pueden formar parte del recubrimiento de la vasculatura tumoral, la presente invención abarca la selección como objetivo de las células tumorales directamente, así como de su vasculatura. El resto de selección del objetivo de la presente invención contiene el motivo RGD o NGR. Se conocen muchos restos de selección del objetivo, y estos y cualquiera que esté disponible posteriormente están abarcados dentro del alcance de la presente invención. En una realización, el resto de selección del objetivo es una molécula de unión, tal como un ligando, de un receptor expresado por una célula tumoral. En la presente memoria se describe una molécula de unión, tal como un anticuerpo, hacia un marcador o un componente de la matriz extracelular asociada a las células tumorales. El resto de selección del objetivo puede ser una molécula de unión, tal como un ligando, de un receptor expresado por los vasos asociados al tumor. En la presente memoria se describe una molécula de unión, tal como un anticuerpo, hacia un marcador endotelial o un componente de la matriz extracelular asociada a los vasos angiogénicos. La expresión molécula de unión se usa en la presente memoria en su sentido más amplio, e incluye los dominios de unión tanto naturales como sintéticos, lo que incluye los ligandos. En la presente memoria se describe una molécula de unión que puede ser un anticuerpo o un fragmento del mismo tal como Fab, Fv, Fv de cadena simple, un péptido o una molécula peptidomimética, concretamente una molécula similar a un péptido capaz de unirse al receptor, un marcador de un componente extracelular de la célula.

30 Lo siguiente representa ejemplos no limitantes de los dominios de selección del objetivo adecuados y receptores/marcadores hacia los que se puede dirigir el conjugado:

CD13

35 Se ha descubierto sorprendentemente que el índice terapéutico de ciertas citocinas se puede mejorar notablemente, y se pueden aumentar sus propiedades inmunoterapéuticas mediante el acoplamiento con un ligando del receptor aminopeptidasa-N (CD 13). CD13 es una glicoproteína transmembrana de 150 kDa muy conservada en diversas especies. Se expresa en las células normales y también en las líneas tumorales mieloides, en el endotelio angiogénico y en ciertos epitelios. El receptor CD13 se identifica normalmente como el receptor "NGR", ya que sus ligandos peptídicos comparten el motivo de aminoácidos "NGR". El ligando es preferiblemente un péptido lineal o cíclico que comprende el motivo NGR, tal como CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cicloCVLNGRMEC o cicloCNGRC, o más preferiblemente el péptido CNGRC. Se pueden hallar detalles adicionales en el documento WO01/61017.

## Integrinas

Las integrinas son heterodímeros unidos de manera no covalente de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Hasta la fecha, se han identificado 16 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ . Estas se pueden combinar de diversas maneras para formar diferentes tipos de receptores de integrinas. Los ligandos para varias de las integrinas son proteínas de la matriz extracelular (ECM) adhesivas tales como fibronectina, vitronectina, colágenos y laminina. Muchas integrinas reconocen la secuencia de aminoácidos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que está presente en fibronectina o las otras proteínas adhesivas a las que se unen. Se pueden usar péptidos y fragmentos de proteínas que contienen la secuencia RGD para modular las actividades de las integrinas que reconocen RGD. Así, la presente invención puede emplear como resto de selección del objetivo los péptidos reconocidos por las integrinas. Estos péptidos se conocen de manera convencional como "péptidos que contienen RGD". Estos péptidos pueden incluir motivos peptídicos en los que se ha identificado la unión a integrinas. Estos motivos incluyen las secuencias de aminoácidos: DGR, NGR y CRGDC. Los motivos peptídicos pueden ser lineales o cíclicos. Tales motivos se describen con más detalle en las patentes siguientes: La Patente de EE.UU. 5.536.814 que describe CRGDCL, CRGDCA y GACRGDCLGA ciclados. La Patente de EE.UU. 4.578.079 se refiere a péptidos sintéticos de fórmula X-RUD-T/C-Y en la que X e Y son aminoácidos. La Patente de EE.UU. 5.547.936 describe un péptido que cuenta con la secuencia X-RGD-XX en la que X puede ser un aminoácido. La Patente de EE.UU. 4.988.621 describe varios péptidos que cuentan con RGD. La Patente de EE.UU. 4.879.237 describe un péptido general de fórmula RGD-Y en la que Y es un aminoácido, y el péptido G-RGD-AP. La Patente de EE.UU. 5.169.930 describe el péptido RGDSPK que se une a la integrina  $\alpha v \beta 1$ . Las Patentes de EE.UU. 5.498.694 y 5.700.908 se refieren al dominio citoplasmático de la subunidad de integrina  $\beta 3$ , que en sentido estricto no es un péptido que contenga RGD; aunque sí contiene la secuencia RDG. El documento WO97/08203 describe péptidos cíclicos que son imitaciones estructurales o sitios de unión de RGD. La Patente de EE.UU. 5.612.311 describe 15 péptidos que contienen RGD que son capaces de ciclarse mediante unión C-C o por medio de otros grupos tales como penicilamina o análogos de ácido mercapto-propiónico. La Patente de EE.UU. 5.672.585 describe una fórmula general que abarca péptidos que contienen RGD. Un grupo preferido de péptidos son aquellos en los que el residuo de ácido aspártico de RGD está derivatizado hasta un derivado de O-metoxi tirosina. La Patente de EE.UU. 5.120.829 describe un sitio de unión RGD que favorece la adhesión celular y un dominio de unión hidrófobo. La forma D se describe en la Patente de EE.UU. 5.587.456. La Patente de EE.UU. 5.648.330 describe un péptido que contiene RGD cíclico que tiene afinidad elevada hacia GP lib/IIIa.

En una realización preferida de la presente invención, el resto de selección del objetivo es un ligando para una integrina  $\alpha v \beta 3$  o  $\alpha v \beta 5$ .

El resto de selección del objetivo es preferiblemente un polipéptido que es capaz de unirse a una célula tumoral o molécula de la superficie de la vasculatura tumoral. Al igual que las mencionadas anteriormente, también se pueden seleccionar como objetivo mediante la primera secuencia otras moléculas de la superficie que son conocidas o que lleguen a estar disponibles.

Se apreciará que se pueden aplicar ensayos de unión de proteínas convencionales para identificar las moléculas que se unen a las moléculas de la superficie. También se apreciará que se puede aplicar el diseño de fármacos basado en la estructura para desarrollar secuencias que se unen a las moléculas de la superficie.

También se puede usar el cribado de alto rendimiento, como se describió anteriormente para los compuestos sintéticos, para identificar las moléculas de selección del objetivo.

Se contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los que los anticuerpos neutralizados capaces de unirse al objetivo compiten de manera específica con un compuesto de ensayo por la unión al objetivo.

## Molécula de unión (BP)

El resto de selección del objetivo en general toma la forma de una molécula de unión (BP) hacia una molécula de la superficie que comprende o que consiste en uno o más dominios de unión.

## Ligando

El resto de selección del objetivo de la presente invención puede tomar la forma de un ligando. Los ligandos pueden ser naturales o sintéticos. El término "ligando" se refiere además a un ligando modificado químicamente. El uno o más dominios de unión de BP pueden consistir, por ejemplo, en un ligando natural para un receptor, cuyo ligando natural puede ser una molécula de adhesión o un ligando de un receptor de un factor de crecimiento (p.ej., factor de crecimiento epidérmico), o un fragmento de un ligando natural que conserva la afinidad de unión por el receptor. Los ligandos sintéticos incluyen los ligandos diseñados. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "ligandos diseñados" se refiere a los agentes que es probable que se unan al receptor basándose en su forma tridimensional comparada con la del receptor.

## Anticuerpos

En la presente memoria se describen dominios de unión derivados de secuencias de las cadenas pesada y ligera de



una región variable de inmunoglobulina (Ig). Tal región variable puede derivar de un anticuerpo humano natural o un anticuerpo de otra especie, tal como un anticuerpo de roedor. De manera alternativa, la región variable puede derivar de un anticuerpo modificado mediante ingeniería genética, tal como un anticuerpo humanizado, o de una biblioteca de expresión en fago de un animal inmunizado o sin inmunizar o una biblioteca de expresión en fago mutagenizada.

5 Como segunda alternativa, la región variable puede derivar de un fragmento variable de cadena simple (scFv). La BP puede contener otras secuencias para llevar a cabo la multimerización o para actuar como espaciadores entre los dominios de unión, o que son el resultado de la inserción de sitios de restricción en los genes que codifican la BP, lo que incluye las secuencias bisagra de Ig o espaciadores nuevos y secuencias ligadoras modificadas.

10 La BP puede comprender, además de una o más regiones variables de inmunoglobulina, todo o parte de una región constante de la cadena pesada de Ig, y así puede comprender una Ig completa natural, una Ig modificada, una molécula similar a una Ig modificada, una Ig de cadena simple o una molécula similar a Ig de cadena simple. De manera alternativa, o además, la BP puede contener uno o más dominios de otra proteína, tal como una toxina.

15 Tal como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los anticuerpos pueden existir en forma de inmunoglobulinas intactas o en forma de varios fragmentos, que incluyen los fragmentos bien caracterizados producidos mediante la digestión con diversas peptidasas. Aunque los diversos fragmentos de anticuerpos se definen en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que los fragmentos de anticuerpos se pueden sintetizar *de novo* químicamente o mediante la utilización de la metodología de ADN recombinante. Así, el término anticuerpo, tal como se usa en la presente memoria, también incluye los fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* mediante el uso de metodologías de ADN recombinante. Los fragmentos de anticuerpo abarcados por el uso del término "anticuerpos" incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv diacuerpos, y fragmentos Fd.

20 En la presente memoria se describen anticuerpos monoclonales o policlonales hacia las proteínas de la superficie. Así, en la presente memoria se describe un proceso para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales hacia los polipéptidos usados en la invención.

25 Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (p.ej., ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunógeno que alberga un/varios epítipo(s). Se recoge el suero del animal inmunizado y se trata según los procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales hacia un epítipo contiene anticuerpos hacia otros antígenos, los anticuerpos policlonales se pueden purificar mediante cromatografía de inmunoafinidad. Los métodos para producir y procesar antisueros policlonales se conocen en la técnica. Para que tales anticuerpos se puedan producir, se describen los polipéptidos de la invención o los fragmentos de los mismos unidos como haptenos a otro polipéptido para el uso como inmunógenos en animales o seres humanos en la presente memoria.

30 Un experto en la técnica también puede producir fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los epítipos de unión de la superficie celular de los polipéptidos. La metodología general para la producción de anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es muy conocida. Se pueden crear líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos mediante fusión celular, y también mediante otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con el virus de Epstein-Barr. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos hacia los epítipos se pueden cribar en función de diversas propiedades; es decir, por isotipo y afinidad por el epítipo.

35 Una técnica alternativa implica las bibliotecas de expresión en fago de cribado en las que, por ejemplo, el fago expresa fragmentos scFv en la superficie de su cubierta con una gran diversidad de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Este método se conoce bien en la técnica.

40 El término "anticuerpo", a menos que se especifique al contrario, incluye los fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión hacia un antígeno objetivo. Como se mencionó anteriormente, tales fragmentos incluyen los fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, así como los anticuerpos de cadena simple (scFv). Además, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo como se describió en el documento EP-A-239400.

#### Ensayos de cribado

45 En la presente memoria se describe un método de cribado de un agente capaz de unirse a un tumor o molécula de la superficie celular de la vasculatura tumoral, y el método comprende poner en contacto la molécula de la superficie celular con un agente y determinar si dicho agente se une a dicha molécula de la superficie celular.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "agente" incluye, pero sin limitación, un compuesto, tal como un compuesto de ensayo, que se puede obtener a partir de o producir mediante cualquier fuente adecuada, ya sea natural o no. El agente se puede diseñar u obtener a partir de una biblioteca de compuestos que pueden comprender péptidos, así como otros compuestos, tales como moléculas orgánicas pequeñas y en particular nuevos compuestos destacados. A modo de ejemplo, el agente puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica, o un extracto producido a partir de materiales biológicos tales como bacterias, hongos, o células o tejidos de un animal

(en particular un mamífero), una molécula orgánica o inorgánica, un compuesto de ensayo sintético, un compuesto de ensayo semi-sintético, una molécula mimética estructural o funcional, un péptido, una molécula peptidomimética, un compuesto de ensayo derivatizado, un péptido escindido de una proteína completa, o un péptido sintetizado de manera sintética (tal como, a modo de ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de péptidos) o mediante técnicas recombinantes o combinaciones de las mismas, un compuesto de ensayo recombinante, un compuesto de ensayo natural o no natural, una proteína de fusión o equivalente de los mismos y los mutantes, derivados o combinaciones de los mismos.

El agente puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de la misma. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro producto químico. El agente puede ser incluso una secuencia nucleotídica, que puede ser una secuencia directa o una secuencia inversa.

Proteína

El término "proteína" incluye las moléculas polipeptídicas de una cadena, así como los complejos polipeptídicos múltiples en los que los polipéptidos constituyentes individuales están unidos mediante medios covalentes o no covalentes. El término "polipéptido" incluye los péptidos de dos o más aminoácidos de longitud, que tienen en general más de 5, 10 ó 20 aminoácidos.

Homólogos de polipéptidos

Se entenderá que las secuencias polipeptídicas para el uso en la invención no se limitan a las secuencias particulares o fragmentos de las mismas, sino que también incluyen las secuencias homólogas obtenidas a partir de cualquier fuente, por ejemplo proteínas virales/bacterianas relacionadas, homólogos celulares y péptidos sintéticos, así como variantes o derivados de las mismas. Las secuencias polipeptídicas de la presente invención incluyen también los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la presente invención.

Variantes, derivados y fragmentos de polipéptidos

Los términos "variante" o "derivado", en relación a las secuencias de aminoácidos de la presente invención, incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de o respecto de la secuencia que proporciona la secuencia de aminoácidos resultante, preferiblemente tiene actividad de selección del objetivo, preferiblemente tiene al menos del 25 al 50% de la actividad de los polipéptidos presentados en las listas de secuencias, más preferiblemente al menos sustancialmente la misma actividad.

Así, las secuencias se pueden modificar para el uso en la presente invención. En general, se hacen modificaciones que mantienen la actividad de la secuencia. Así, en una realización, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones, con tal de que la secuencia modificada conserve al menos alrededor del 25 al 50%, o sustancialmente la misma actividad. Sin embargo, en una realización alternativa, se pueden hacer modificaciones respecto de las secuencias de aminoácidos de un polipéptido de la invención intencionadamente para reducir la actividad biológica del polipéptido. Por ejemplo, pueden ser útiles los polipéptidos truncados que siguen siendo capaces de unirse a la molécula objetivo pero que carecen de dominios efectores funcionales.

En general, se alteran preferiblemente menos del 20%, 10% o 5% de los residuos de aminoácidos de una variante o derivado en comparación con la región correspondiente representada en las listas de secuencias.

Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos que no se dan de manera natural, por ejemplo para incrementar la semivida en el plasma sanguíneo de un polipéptido administrado terapéuticamente (véanse más adelante los detalles adicionales sobre la producción de derivados de péptidos para el uso en la terapia).

Se pueden hacer sustituciones conservativas, por ejemplo según la Tabla siguiente. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre sí:

ALIFÁTICOS	Apolar	G A P
		I L V
	Polar - sin carga	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
K R		
AROMÁTICOS		H F W Y

Los polipéptidos de la invención incluyen también los fragmentos de los polipéptidos anteriormente mencionados y las variantes de los mismos, que incluyen los fragmentos de las secuencias. Los fragmentos preferidos incluyen los que incluyen un epítipo. Los fragmentos adecuados tendrán una longitud de al menos alrededor de 5, p.ej. 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos. También pueden tener una longitud menor de 200, 100 ó 50 aminoácidos. Los fragmentos polipeptídicos de las proteínas y las variantes alélicas y de especies de los mismos pueden contener una o más (p.ej. 2, 3, 5, o 10) sustituciones, deleciones o inserciones, lo que incluye las sustituciones conservadas. Cuando se hacen sustituciones, deleciones y/o inserciones, por ejemplo por medio de técnicas recombinantes, preferiblemente se alteran menos del 20%, 10% o 5% de los residuos de aminoácidos representados en las listas de secuencias.

Las proteínas de la invención se producen en general por medios recombinantes, por ejemplo como se describe más adelante. Sin embargo, se pueden hacer también por medios sintéticos con el uso de técnicas muy conocidas para las personas expertas, tales como la síntesis en fase sólida. Las diversas técnicas para la síntesis química de péptidos se revisan en Borgia y Fields, 2000, TibTech 18: 243-251 y se describen con detalle en las referencias contenidas en ese documento.

#### Péptidos terapéuticos

Los péptidos usados en la presente invención se pueden administrar terapéuticamente a los pacientes. Se prefiere usar péptidos que no consistan únicamente en aminoácidos que se dan de manera natural, sino que hayan sido modificados, por ejemplo para reducir la inmunogenicidad, para incrementar la semivida circulatoria en el cuerpo del paciente, para aumentar la biodisponibilidad y/o para aumentar la eficacia y/o la especificidad.

Se han usado varias aproximaciones para modificar péptidos para la aplicación terapéutica. Una aproximación es unir los péptidos o proteínas a una diversidad de polímeros, tales como polietileno glicol (PEG) y polipropileno glicol (PPG), véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5.091.176, 5.214.131 y US 5.264.209.

También se puede usar la sustitución de aminoácidos que se dan de manera natural con una diversidad de aminoácidos no codificados o modificados, tales como D-aminoácidos y N-metil aminoácidos, para modificar los péptidos.

Otra aproximación es usar entrecruzadores bifuncionales, tales como 3-(2 piridilditio)propionato de N-succinimidilo, 6-[3-(2 piridilditio)propionamido]hexanoato de succinimidilo, y 6-[3-(2 piridilditio)propionamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (véase la Patente de EE.UU. 5.580.853).

Puede ser deseable usar derivados de los péptidos usados en la invención que estén limitados conformacionalmente. La limitación conformacional se refiere a la estabilidad y conformación preferida de la forma tridimensional adoptada por un péptido. Las limitaciones conformacionales incluyen las limitaciones locales, que implican la restricción de la movilidad conformacional de un único residuo en un péptido; las limitaciones regionales, que implican la restricción de la movilidad conformacional de un grupo de residuos, cuyos residuos pueden formar cierta unidad estructural secundaria; y limitaciones globales, que implican la estructura peptídica completa.

La conformación activa del péptido se puede estabilizar mediante una modificación covalente, tal como ciclación, o mediante la incorporación de gamma-lactama u otros tipos de puentes. Por ejemplo, las cadenas laterales se pueden ciclar con el esqueleto para crear un resto de L-gamma-lactama a cada lado del sitio de interacción. Véase, en general, Hruby et al., "Applications of Synthetic Peptides", en Synthetic Peptides: A User's Guide: 259-345 (W. H. Freeman & Co. 1992). La ciclación también se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la formación de puentes de cisteínas, mediante el acoplamiento de los grupos amino y carboxi terminales de los aminoácidos terminales respectivos, o mediante el acoplamiento del grupo amino de un residuo de Lys o un homólogo relacionado con un grupo carboxi de Asp, Glu o un homólogo relacionado. También se puede llevar a cabo el acoplamiento del grupo alfa-amino de un polipéptido con el grupo épsilon-amino de un residuo de lisina, mediante el uso de anhídrido yodoacético. Véase Wood y Wetzel, 1992, Int'l J. Peptide Protein Res. 39: 533-39.

Otra aproximación descrita en el documento US 5.891.418 es incluir un esqueleto complejante de iones metálicos en la estructura del péptido. En general, el esqueleto péptido-metal preferido se basa en el número necesario de grupos de coordinación particulares requeridos por la esfera de coordinación de un ión metálico de complejación. En general, la mayoría de los iones metálicos que se puede demostrar que son útiles tienen un número de coordinación de cuatro a seis. La naturaleza de los grupos de coordinación de la cadena peptídica incluye átomos de nitrógeno con funcionalidades amina, amida, imidazol, o guanidino; átomos de azufre de tioles o disulfuros; y átomos de oxígeno de funcionalidades hidroxilo, fenólico, carbonilo, o carboxilo. Además, la cadena peptídica o los aminoácidos individuales se pueden alterar químicamente para que incluyan un grupo de coordinación, tal como por ejemplo oxima, hidrazino, sulfhidrilo, fosfato, ciano, piridino, piperidino, o morfolino. La construcción peptídica puede ser lineal o cíclica, sin embargo se prefiere en general una construcción lineal. Un ejemplo de un péptido lineal pequeño es Gly-Gly-Gly-Gly que tiene cuatro nitrógenos (un sistema de complejación  $N_4$ ) en el esqueleto que puede complejar un ión metálico con un número de coordinación de cuatro.

Una técnica adicional para mejorar las propiedades de los péptidos terapéuticos es usar moléculas peptidomiméticas no peptídicas. Se puede usar una amplia diversidad de técnicas útiles para dilucidar la estructura exacta de un péptido. Estas técnicas incluyen la secuenciación de aminoácidos, cristalografía de rayos X, espectroscopía de

masas, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, modelización molecular asistida por ordenador, cartografía de péptidos, y combinaciones de las mismas. El análisis estructural de un péptido proporciona en general una gran cantidad de datos que comprenden la secuencia de aminoácidos del péptido, así como la colocación tridimensional de sus componentes atómicos. A partir de esta información, se pueden diseñar moléculas peptidomiméticas no peptídicas que tienen las funcionalidades químicas necesarias para la actividad terapéutica, pero que son más estables, por ejemplo menos susceptibles a la degradación biológica. Un ejemplo de esta aproximación se proporciona en el documento US 5.811.512.

Las técnicas para sintetizar químicamente los péptidos terapéuticos de la invención se describen en las referencias anteriores y también se revisan en Borgia y Fields, 2000, TibTech 18: 243-251 y se describen con detalle en las referencias contenidas en ese documento.

#### Derivados bifuncionales

Se proporciona una realización adicional de la invención mediante derivados bifuncionales en los que las citocinas modificadas con un TTM se conjugan con anticuerpos, o sus fragmentos, hacia antígenos tumorales u otros marcadores angiogénicos tumorales, p.ej. integrinas  $\alpha_v$ , metaloproteasas o el factor de crecimiento vascular, o anticuerpos o fragmentos de los mismos dirigidos hacia componentes de la matriz extracelular, tales como anticuerpos anti-tenascina o dominio EDB anti-fibronectina. Recientemente se ha informado de la preparación de un producto de fusión entre TNF y la región de la bisagra de un mAb hacia el antígeno TAG72 asociado a tumores expresado por el adenocarcinoma gástrico y ovárico.

Se proporciona una realización adicional de la invención mediante la pre-selección tumoral con el sistema biotina/avidina. Según esta aproximación, se obtiene un complejo ternario en el sitio antigénico tumoral, en etapas diferentes, que se forma mediante 1) mAb biotinilado, 2) avidina (o estreptavidina) y 3) citocina bivalente modificada con el TTM y biotina. Varios artículos demostraron que la aproximación de pre-selección del objetivo, en comparación con la selección convencional del objetivo con inmunoconjugados, puede incrementar realmente la proporción de molécula activa dirigida al objetivo respecto de la molécula activa libre, por lo que se reduce la toxicidad del tratamiento. Esta aproximación produjo resultados favorables con TNF biotinilado, que fue capaz de inducir citotoxicidad *in vitro* y disminuir el crecimiento de las células tumorales en condiciones en las que el TNF normal fue inactivo. La aproximación de pre-selección del objetivo se puede llevar a cabo también con un procedimiento de dos fases mediante el uso de un anticuerpo biespecífico que se une al mismo tiempo al antígeno tumoral y a la citocina modificada. El uso de un anticuerpo biespecífico dirigido hacia un antígeno carcinoembrionario y TNF se ha descrito recientemente como un medio para la pre-selección del objetivo tumoral de TNF.

Según una realización adicional, la invención comprende el uso de una citocina conjugada tanto a un TTM como a un anticuerpo, o un fragmento del mismo (directamente o indirectamente por medio de un puente biotina-avidina), en subunidades de TNF diferentes, en el que el anticuerpo o sus fragmentos se dirigen contra un antígeno expresado en las células tumorales u otros componentes del estroma tumoral, p.ej. tenascina y el dominio EDB de fibronectina. Esto da como resultado una mejora adicional de las propiedades de selección como objetivo del tumor de la citocina modificada, y la liberación lenta de esta última en el microentorno del tumor por medio de transiciones trímero-monomero-trímero. Las subunidades modificadas, p.ej., de los conjugados de TNF se pueden disociar de los complejos de selección del objetivo, y reasociarse para formar moléculas de TNF triméricas sin modificar, que después se difunden en el microentorno del tumor. Se ha demostrado que la liberación de TNF bioactivo se da en 24-48 horas tras la selección del objetivo.

La preparación de citocinas en forma de liposomas puede mejorar la actividad biológica de las mismas. De hecho, se ha observado que la acilación de los grupos amino de TNF induce un incremento de su hidrofobicidad sin pérdida de la actividad biológica *in vitro*. Además, se ha informado que el TNF unido a lípidos tiene una citotoxicidad inalterada *in vitro*, efectos inmunomoduladores y toxicidad reducida *in vivo*.

#### Polinucleótidos

Los polinucleótidos para el uso en la invención comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican el conjugado polipeptídico de la invención. Una persona experta entenderá que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, se debe entender que las personas expertas, mediante el uso de técnicas rutinarias, pueden hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos de la invención para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedador particular en el que se van a expresar los polipéptidos de la invención.

Los polinucleótidos para el uso en la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica varios tipos diferentes de modificaciones de oligonucleótidos. Estas incluyen los esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, la adición de acridina o cadenas de polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se debe entender que los polinucleótidos descritos en la presente memoria se pueden modificar mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones se pueden

llevar a cabo para aumentar la actividad *in vivo* o la duración de los polinucleótidos de la invención.

#### Vectores de nucleótidos

Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar en un vector replicable recombinante. El vector se puede usar para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. En la presente memoria se describe un método de producción de polinucleótidos para el uso en la invención mediante la introducción de un polinucleótido para el uso en la invención en un vector replicable, la introducción del vector en una célula hospedadora compatible, y el cultivo de la célula hospedadora en condiciones que provocan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula hospedadora. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura, líneas celulares de mamífero y otras líneas celulares eucarióticas, por ejemplo células Sf9 de insecto.

Preferiblemente, un polinucleótido para el uso en la invención en un vector está unido de forma operable a una secuencia de control que es capaz de mantener la expresión de la secuencia codificante por parte de la célula hospedadora, es decir, el vector es un vector de expresión. La expresión "unido de forma operable" significa que los componentes descritos están en una relación que los permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia reguladora "unida de forma operable" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Las secuencias de control se pueden modificar, por ejemplo mediante la adición de elementos reguladores transcripcionales adicionales para hacer que el nivel de la transcripción dirigida por las secuencias de control sea más sensible a los moduladores transcripcionales.

Los vectores para el uso en la invención se pueden transformar o transfectar en una célula hospedadora adecuada como se describe más adelante para mantener la expresión de una proteína de la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión como se describió anteriormente en condiciones que mantienen la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifica la proteína, y opcionalmente recuperar la proteína expresada.

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

Las secuencias de control unidas de forma operable a las secuencias que codifican la proteína de la invención incluyen promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control se pueden seleccionar para que sean compatibles con la célula hospedadora en la que se va a usar el vector de expresión diseñado. El término "promotor" es muy conocido en la técnica, y abarca regiones de ácidos nucleicos que varían en tamaño y complejidad desde promotores mínimos a promotores que incluyen elementos en posición 5' y potenciadores.

El promotor se selecciona en general de los promotores que son funcionales en las células de mamífero, aunque se pueden usar promotores procarióticos y promotores funcionales en otras células eucarióticas. El promotor deriva en general de secuencias promotoras de genes virales o eucarióticos. Por ejemplo, puede ser un promotor derivado del genoma de una célula en la que se va a dar la expresión. Con respecto a los promotores eucarióticos, pueden ser promotores que funcionan de una manera ubicua (tales como promotores de  $\alpha$ -actina,  $\beta$ -actina, tubulina) o, de manera alternativa, de una manera específica de tejido (tales como promotores de los genes de piruvato quinasa). También se pueden usar promotores específicos de tejido específicos para ciertas células. También pueden ser promotores que responden a estímulos específicos, por ejemplo promotores que se unen a receptores de hormonas esteroides. También se pueden usar promotores virales, por ejemplo el promotor de la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (LTR MMLV), el promotor de la LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) o el promotor IE de citomegalovirus (CMV) humano.

También puede ser ventajoso que los promotores sean inducibles, de forma que los niveles de expresión del gen heterólogo se puedan regular durante la vida de la célula. Inducible significa que se pueden regular los niveles de expresión obtenidos mediante el uso del promotor.

Además, cualquiera de estos promotores se puede modificar mediante la adición de secuencias reguladoras adicionales, por ejemplo secuencias potenciadoras. También se pueden usar promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

#### Células hospedadoras

Los vectores y polinucleótidos para el uso en la invención se pueden introducir en células hospedadoras con el propósito de replicar los vectores/polinucleótidos y/o expresar las proteínas de la invención codificadas por los polinucleótidos de la invención. Aunque las proteínas para el uso en la invención se pueden producir mediante el uso de células procarióticas como células hospedadoras, se prefiere usar células eucarióticas, por ejemplo células de

levadura, insecto o mamífero, en particular células de mamífero.

5 Los vectores/polinucleótidos de la invención se pueden introducir en células hospedadoras adecuadas mediante el uso de una diversidad de métodos conocidos en la técnica, tales como transfección, transformación y electroporación. Cuando se van a administrar los vectores/polinucleótidos de la invención a animales, se conocen varios métodos en la técnica, por ejemplo la infección con vectores virales recombinantes tales como retrovirus, virus herpes simple y adenovirus, la inyección directa de ácidos nucleicos y la transformación biolística.

#### Expresión y purificación de proteínas

10 Las células hospedadoras que comprenden los polinucleótidos de la invención se pueden usar para expresar las proteínas de la invención. Las células hospedadoras se pueden cultivar en condiciones adecuadas que permiten la expresión de las proteínas de la invención. La expresión de las proteínas de la invención puede ser constitutiva, de forma que se producen continuamente, o inducible, lo que requiere un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de la expresión inducible, la producción de proteínas se puede iniciar cuando sea necesario, por ejemplo, mediante la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo dexametasona o IPTG.

15 Las proteínas para el uso en la invención se pueden extraer de las células hospedadoras mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen la lisis enzimática, química y/u osmótica y la ruptura física.

#### Administración

20 Las proteínas de la invención se pueden combinar preferiblemente con diversos componentes para producir las composiciones de la invención. Preferiblemente, las composiciones se combinan con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica (que puede ser para uso humano o animal). Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen solución salina isotónica, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. Los detalles de los excipientes se pueden hallar en The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª Ed., Eds Wade & Weller, American Pharmaceutical Association. La composición de la invención se puede administrar mediante inyección directa. La composición se puede formular para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica. En general, cada proteína se puede administrar en una dosis en el intervalo de 0,5 a 500 ng/kg, preferiblemente en el intervalo de 1 a 50 ng/kg, más preferiblemente en el intervalo de 5 a 15 ng/kg.

30 En un aspecto alternativo, se proporciona una composición farmacéutica para el uso según la invención que comprende un conjugado, en el que el conjugado está presente en una cantidad de forma que el conjugado o un metabolito del mismo se proporciona al plasma sanguíneo del sujeto a tratar en una cantidad no mayor de alrededor de 35.000 ng/día, preferiblemente alrededor de 3.500 ng/día, más preferiblemente alrededor de 1.000 ng/día.

La dosis anterior se refiere a una dosis para un sujeto de 70 kg. Una persona experta en la técnica sería capaz de modificar fácilmente la dosis mencionada para un sujeto que tenga una masa distinta de 70 kg.

35 La dosis por día se calcula dividiendo la dosis a administrar al sujeto por el periodo de dosificación previsto en días. El periodo de dosificación previsto será en general el periodo hasta la siguiente administración, el periodo a lo largo del cual la dosis debe tener efecto o el periodo a lo largo del cual es necesario que la dosis tenga efecto.

La composición se puede formular de forma que la administración diaria, semanal o mensual proporcione la dosis diaria deseada. Se apreciará que la composición se puede formular de manera conveniente para administrarla con menos frecuencia, como cada 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 horas.

40 Los polinucleótidos/vectores que codifican los componentes polipeptídicos se pueden administrar directamente en forma de una construcción de ácido nucleico desnudo, preferiblemente que comprende además secuencias flanqueantes homólogas al genoma de la célula hospedadora.

45 La absorción de construcciones de ácido nucleico desnudo por las células de mamífero se aumenta mediante varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes incluyen los agentes catiónicos (por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE-dextrano) y los lipofectantes (por ejemplo lipofectam™ y transfectam™). En general, las construcciones de ácidos nucleicos se mezclan con el agente de transfección para producir una composición.

50 Preferiblemente, el polinucleótido o vector para el uso en la invención se combina con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen solución salina isotónica, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. La composición se puede formular para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica.

Las vías de administración y los regímenes de dosis descritos pretenden ser únicamente una guía, ya que el médico experto podrá determinar fácilmente la vía de administración óptima y los regímenes de dosis para cualquier paciente y afección particular.

## Vectores virales

En una realización preferida, el conjugado se administra mediante el uso de un vector viral, más preferiblemente un vector retroviral.

## Retrovirus

5 El vector retroviral para el uso en la presente invención puede derivar o puede ser derivable de cualquier retrovirus adecuado. Se puede identificar un gran número de retrovirus diferentes. Los ejemplos incluyen: virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la inmunodeficiencia de simios, virus de la leucemia de células T humana (HTLV), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), virus del osteosarcoma murino de FBR (FBR-MSV), virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), virus-29 de la mielocitomatosis aviar (MC29), y virus de la eritroblastosis aviar (AEV). Una lista detallada de retrovirus se puede hallar en Coffin et al., 1997, "retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus págs. 758-763.

10 Los detalles sobre la estructura genómica de ciertos retrovirus se pueden hallar en la técnica. A modo de ejemplo, se pueden hallar detalles sobre HIV y Mo-MLV en Genbank del NCBI (N<sup>o</sup>s de acceso de genomas AF033819 y AF033811, respectivamente).

15 Los retrovirus se pueden dividir en líneas generales en dos categorías: concretamente, "simple" y "complejo". Los retrovirus se pueden dividir adicionalmente en siete grupos. Cinco de estos grupos representan retrovirus con potencial oncogénico. Los dos grupos restantes son los lentivirus y los spumavirus. Se presenta una revisión de estos retrovirus en Coffin *et al.*, 1997 (ibídem).

20 El grupo de lentivirus se puede dividir adicionalmente en "primate" y "no primate". Los ejemplos de lentivirus de primate incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) humano, y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV). El grupo lentiviral que no es de primates incluye el prototipo "virus lento" virus visna/maedi (VMV), así como el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y el descubierto más recientemente virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV).

25 Esta invención se refiere además al uso de vectores para la administración de un conjugado en forma de una secuencia nucleotídica a un hemocitoblasto (HSC).

30 La transferencia génica implica la administración a las células objetivo, tales como HSCs, de un casete de expresión constituido por una o más secuencias nucleotídicas y las secuencias que controlan su expresión. Esto se puede llevar a cabo *ex vivo* en un procedimiento en el que el casete se transfiere a las células en el laboratorio y las células modificadas se administran después a un receptor. De manera alternativa, la transferencia génica se puede llevar a cabo *in vivo* en un procedimiento en el que el casete de expresión se transfiere directamente a las células dentro de un individuo. En ambas estrategias, el proceso de transferencia se facilita normalmente mediante un vector que ayuda a administrar el casete en el sitio intracelular adecuado.

35 La médula ósea ha sido la fuente tradicional de HSCs para la transducción, y los estudios más recientes han propuesto que los hemocitoblastos o las células sanguíneas de cordón umbilical pueden ser células objetivo igualmente buenas o mejores (Cassel et al 1993 Exp Hematol 21: 585-591; Bregni et al 1992 Blood 80: 1418-1422; Lu et al 1993 J Exp Med 178: 2089-2096).

## 40 Agentes antineoplásicos adicionales

El conjugado para el uso en la presente invención se puede usar en combinación con uno o más agentes activos adicionales, tales como uno o más fármacos citotóxicos. Así, en un aspecto de la presente invención, el método comprende además administrar otro ingrediente farmacéutico activo, tal como un fármaco citotóxico, en una forma farmacéutica combinada con el conjugado o en una forma farmacéutica distinta. Tal forma farmacéutica distinta del fármaco citotóxico puede incluir una forma oral sólida, disolución oral, jarabe, elixir, una forma inyectable, transdérmica, transmucosa, u otra forma farmacéutica. El conjugado y el otro ingrediente farmacéutico activo se pueden combinar en una forma farmacéutica o se pueden suministrar en formas farmacéuticas distintas que son utilizables juntas o de manera secuencial.

45 Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden usar en la presente invención incluyen: Los fármacos alquilantes, tales como ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, melfalano, busulfano, lomustina, carmustina, clormetina (mustina), estramustina, treosulfano, tiotepa, mitobronitol; antibióticos citotóxicos, tales como doxorubicina, epirubicina, aclarrubicina, idarrubicina, daunorubicina, mitoxantrona (mitozantrona), bleomicina, dactinomicina y mitomicina; antimetabolitos, tales como metotrexato, capecitabina, citarabina, fludarabina, cladribina, gemcitabina, fluorouracilo, raltitrexed, mercaptopurina, tegafur y tioguanina; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, y etopósido; otros fármacos anti-neoplásicos, tales como amsacrina, altretamina, crisantaspa, dacarbazina y temozolomida, hidroxycarbamida (hidroxiurea), pentostatina, compuestos

de platino que incluyen: carboplatino, cisplatino y oxaliplatino, porfímero sódico, procarbazona, razoxano, taxanos que incluyen: docetaxel y paclitaxel, inhibidores de la topoisomerasa I que incluyen: irinotecano y topotecano, trastuzumab, y tretinoína.

En una realización preferida, el fármaco citotóxico adicional es doxorubicina, melfalano o cisplatino.

- 5 El conjugado de la presente invención se puede usar también para utilizar la permeabilidad de las células y vasos tumorales hacia los compuestos para fines de diagnóstico. Por ejemplo, el conjugado se puede usar para incrementar la absorción del tumor de anticuerpos u hormonas radiomarcadas (compuestos de formación de imágenes de tumores) en la radioinmunoescintigrafía o radioterapia de tumores.

### Figuras y Ejemplos

- 10 La presente invención se describirá adicionalmente mediante referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras no limitantes, en los que:

Fig. 1 Efecto de mTNF y NGR-mTNF sobre el crecimiento tumoral y el peso corporal de animales que albergaban linfomas RMA-T.

- 15 Los animales que albergaban tumores RMA-T (5 ratones/grupo) se trataron i.p. con NGR-mTNF o mTNF en el día 12 tras la implantación del tumor (A) o en el día 10, 11 y 12 (B), en dos experimentos distintos (Exp. 1 y Exp. 2). Se muestran los volúmenes tumorales en el Exp. 1 (A) y Exp. 2 (B) y el peso corporal de los animales en el Exp. 1 (C) 1-4 días tras el tratamiento. Las flechas en el panel C indican el momento del tratamiento.

Fig. 2 Niveles circulantes de sTNF-R2 y su papel en la regulación de la actividad de NGR-mTNF y NGR-hTNF.

- 20 Panel A: niveles séricos de sTNF-R1 y sTNF-R2 en los ratones que albergaban el tumor B16F1 1 hora tras el tratamiento con diversas dosis de NGR-mTNF o mTNF. Los animales (3 ratones/grupo) se trataron en el día 6.

Panel B: efecto del mAb anti-sTNF-R2 6G1 sobre la actividad anti-tumoral de NGR-mTNF. Se administró mAb 6G1 (100 µg) a animales que albergaban tumores B16F1 en los días 5 y 8. Una hora más tarde, cada animal se trató con NGR-mTNF a las dosis indicadas, y 2 horas más tarde con melfalano (90 µg, 5 ratones/grupo).

- 25 Panel C: efecto de NGR-hTNF y hTNF sobre el crecimiento de los tumores RMA-T. Los ratones se trataron con diversas dosis de cada citocina en el día 11. N.S.: no significativo (prueba t).

Fig. 3 Efecto de melfalano, solo (A) o en combinación con NGR-mTNF (C) o mTNF (D), sobre el crecimiento tumoral (A-D) y el peso corporal (E-F) de ratones que albergaban el melanoma B16F1.

Los animales se trataron (i.p.) con los fármacos y las dosis indicadas en cada panel (5 animales/grupo) en el día 4, 7 y 9 tras la implantación del tumor (indicada por las flechas).

- 30 Fig. 4 Efecto de diversas dosis de doxorubicina, sola (barras blancas) o en combinación con NGR-mTNF (barras negras) sobre el crecimiento tumoral (A, B) peso corporal (C, D) y supervivencia (E) de ratones que albergaban melanomas B16F1.

Los fármacos se administraron a los animales (5 ratones/grupo i.p.) 5 días tras la implantación del tumor.

Fig. 5 Papel de los receptores de TNF en la actividad sinérgica de NGR-mTNF y melfalano.

- 35 Panel A: efecto del mAb V1q (un anticuerpo neutralizante anti-mTNF) sobre la actividad anti-tumoral de melfalano en combinación con NGR-mTNF en el modelo de B16F1. Los fármacos se administraron en el día 5. El mAb V1q y NGR-TNF se pre-mezclaron e incubaron durante 1 hora antes de la inyección a los animales.

Panel B: efecto de melfalano en combinación con NGR-hTNF a las dosis indicadas.

Fig. 6 Efecto de NGR-mTNF sobre la penetración de doxorubicina en tumores B16F1 y RMA-T.

- 40 Panel A: microscopía de campo claro (paneles superiores) y de fluorescencia (paneles inferiores) de células B16F1 incubadas *in vitro* con 100 µg/ml de doxorubicina (30 min, 37 °C). Recuadro: fusión de las imágenes de campo claro y de fluorescencia.

- 45 Panel B: estabilidad de la señal de fluorescencia de B16F1 tras el tratamiento *in vitro* con doxorubicina. Las células B16F1 se incubaron con diversas dosis de doxorubicina en medio de cultivo (30 min, 37 °C), se lavaron con un 0,9% de cloruro sódico, y se fijaron con un 4% de formaldehído. Las células se incubaron después durante 0 horas o 24 horas en medio de cultivo a 4 °C, se lavaron otra vez y se analizaron mediante FACS.

Panel C, F: análisis de FACS representativo de células recuperadas de tumores B16F1 (C) o RMA-T (F) 2 horas tras la administración *in vitro* de doxorubicina sola (320 µg) o en combinación con NGR-mTNF (0,1 ng). Las líneas discontinuas indican el intervalo de fluorescencia considerado positivo.



Panel D, G: fluorescencia media  $\pm$  EE de células B16F1 (D) o RMA-T (G) recuperadas de tumores.

Panel E, H: media  $\pm$  EE de células positivas recuperadas de tumores B16F1 (E) RMA-T (H).

Análisis estadístico mediante prueba t bilateral,  $P < 0,05$  (\*).

5 Fig. 7 Representación esquemática de las interacciones hipotéticas de dosis bajas (A), moderadas (B) y elevadas (C) de NGR-TNF con receptores solubles y de membrana en vasos normales (CD13-negativos) y en vasos asociados a tumores (CD13-positivos).

Las flechas negras indican la señalización del receptor de TNF o la escisión del dominio extracelular.

Fig. 8 Efecto de RGD-TNF sobre el crecimiento tumoral (Fig. 8A) y el peso corporal (Fig. 8B) de un animal que albergaba RMA-T.

10 Fig. 9 Efecto de un único tratamiento (flecha) con IFN $\gamma$ -NGR sobre el crecimiento de linfomas RMA en ratones C57B6 (Fig. 9A y Fig. 9C) y sobre el peso de los animales (Fig. 9B).

Fig. 10 Efecto de NGR-TNF y cisplatino sobre tumores RMA en ratones C57/BL6.

#### Ejemplo 1 - Líneas celulares tumorales y reactivos.

15 Se cultivaron células de melanoma B16F1 y de linfoma RMA-T de ratón como se describió previamente (14, 15). Se produjo un mAb 6G1 (antagonista del receptor de mTNF, anti-p75 de rata) y se caracterizó como se describió previamente (16, 17). El mAb V1q (anti-mTNF de rata) fue amablemente proporcionado por el Dr. D. Mannel (Universidad de Regensburg, Alemania). Melfalano (Alkeran) se obtuvo de Glaxo-Wellcome (Londres, Gran Bretaña). Doxorubicina (Adriplastina) se adquirió de Pharmacia-Upjohn (Milán, Italia).

#### Ejemplo 2 - Preparación de TNF y NGR-TNF humano y murino.

20 Se preparó TNF y NGR-TNF humano y murino (que consistía en TNF fusionado con el extremo C-terminal de CNGRCG) mediante técnicas de ADN recombinante y se purificó a partir de extractos celulares de *E. coli* como se describió (14). Todas las disoluciones usadas en las etapas cromatográficas se prepararon con agua estéril y exenta de endotoxinas (Salf, Bérgamo, Italia). Se midió la concentración de proteínas con un equipo de ensayo de cuantificación de proteínas comercial (Pierce, Rockford, IL). La actividad citolítica *in vitro* de TNF humano (hTNF), estimada a partir de un ensayo citolítico estándar con fibroblastos de ratón L-M (18), fue  $5,4 \times 10^7$  Unidades/mg, mientras que la de NGR-hTNF purificado fue  $1,4 \times 10^8$  Unidades/mg. La actividad citolítica de TNF murino (mTNF) fue  $7,6 \times 10^7$  Unidades/mg, mientras que la de NGR-mTNF fue  $9,1 \times 10^7$  Unidades/mg. Los volúmenes hidrodinámicos de NGR-mTNF, NGR-hTNF y mTNF fueron similares a los de hTNF, una proteína homotrimerica (19), mediante cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 75 HR (Pharmacia, Suecia). La espectrometría de masas por electrospray de cada producto determinó las siguientes masas moleculares: NGR-hTNF,  $17937,6 \pm 1,9$  Da (esperada para los monómeros CNGRCG-hTNF $_{1-157}$ , 17939,4 Da); hTNF,  $17349 \pm 1,3$  (esperada para hTNF $_{1-157}$ , 17350,7); NGR-mTNF,  $17841,16 \pm 2,5$  (esperada para CNGRCG-mTNF $_{1-156}$ , 17844,2), mTNF,  $17384,9 \pm 2$  (esperada para Met-mTNF $_{1-156}$ , 17386,7). El contenido de endotoxina de cada producto, medido mediante el uso del ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) cromogénico cuantitativo (BioWhittaker), fue: NGR-hTNF, 0,079 Unidades/ $\mu$ g; hTNF, 0,117 Unidades/ $\mu$ g; NGR-mTNF, 0,082 Unidades/ $\mu$ g; mTNF, 1,61 Unidades/ $\mu$ g.

#### Ejemplo 3 - Estudios *in vivo*.

40 Los estudios en modelos animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Científico San Raffaele H y llevados a cabo según las directrices prescritas. Los ratones C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italia), que pesaban 16-18 g, se expusieron con una inyección subcutánea en el flanco izquierdo de  $5 \times 10^4$  células vivas de RMA-T o B16F1; 4-12 días más tarde, los ratones se trataron con disoluciones de TNF o NGR-TNF (100  $\mu$ l), seguido 2 horas más tarde por la administración de una disolución de melfalano o doxorubicina (100  $\mu$ l). A menos que se especifique, todos los fármacos se administraron de manera intraperitoneal (i.p.). Todos los fármacos se diluyeron con un 0,9% de cloruro sódico, que contenía 100  $\mu$ g/ml de albúmina sérica humana exenta de endotoxinas (Farma-Biagini, Lucca, Italia), excepto para doxorubicina, que se diluyó con un 0,9% de cloruro sódico solo. Se monitorizó el crecimiento tumoral diariamente midiendo los tumores con un calibre como se describió previamente (20). Los animales se sacrificaron antes de que los tumores alcanzasen 1,0-1,5 cm de diámetro. Los tamaños de los tumores se muestran como la media  $\pm$  EE (5 animales/grupo).

#### Ejemplo 4 - Ensayos del receptor de TNF soluble.

50 Se midió el receptor de TNF p55 soluble (sTNF-R1) y el receptor de TNF p75 soluble (sTNF-R2) en los sueros de los animales mediante el uso del equipo Quantikine M (R & D Systems, Minneapolis, MN 55413).

## Ejemplo 5 - Detección de doxorubicina en tumores.

Los ratones C57/BL6 que albergaban tumores B16F1 o RMA-T (diámetro, 0,5-1 cm) se trataron con o sin NGR-mTNF (0,1 ng, i.p.), seguido 2 horas más tarde por doxorubicina (320 µg, i.p.). Después de 2 horas los animales se sacrificaron y se extirparon los tumores. Cada tumor se pesó, se disgregó, se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y se filtró a través de filtros de 70 µm. Las células se resuspendieron con PBS frío (50 ml), se centrifugaron (1500 rpm, 10 min, 4 °C), se resuspendieron en PBS frío (2,5 ml/g de tejido tumoral) y se mezclaron con PBS recién preparado que contenía un 8% de formaldehído (2,5 ml/g de tejido). Las células se almacenaron en la oscuridad a 4 °C durante la noche, y después se analizaron mediante FACS. El FACScan (Becton-Dickinson) se calibró con las células recuperadas de los tumores sin tratar. Cada muestra se analizó después mediante el uso del filtro FL-3 y el programa informático Cell Quest.

## Ejemplo 6 Curvas dosis-respuesta de NGR-mTNF y mTNF en modelos de linfoma y melanoma murino.

La actividad anti-tumoral de NGR-mTNF y mTNF se caracterizó primero en ausencia de fármacos antineoplásicos. Para comparar las curvas dosis-respuesta de NGR-mTNF y mTNF se llevaron a cabo varios experimentos basados en la administración simple o repetida (i.p.) de diversas dosis de NGR-mTNF y mTNF (de 0,01 a 10000 ng) a ratones que albergaban linfomas RMA-T o melanomas B16F1. El TNF murino retrasó el crecimiento tumoral cuando se administró a dosis elevadas (10000 ng) (Fig. 1A); no se indujo ningún efecto con dosis menores de 100 ng, con administraciones simples (Fig. 1A) o repetidas (Fig. 1B). NGR-mTNF fue notablemente más potente. En este caso se observaron efectos anti-tumorales aún con dosis tan bajas como 0,01 ng (Fig. 1A, B). Sin embargo, la curva dosis-respuesta fue más compleja. Por ejemplo, el efecto de 10 ng fue sorprendentemente menor que el de 0,01-0,1 ng y 1000-10000 ng. Se observó una curva dosis-respuesta con forma de campana en otros experimentos llevados a cabo en el modelo de RMA-T, así como en el modelo de melanoma B16F1 (no mostrado). Estos resultados sugieren que 1) la eficacia de las dosis bajas de NGR-mTNF es notablemente mayor que la de mTNF, y 2) las dosis de NGR-mTNF mayores de 1-10 ng activan mecanismos de retroinhibición que inhiben su actividad anti-tumoral potencial.

Ejemplo 7 - Las dosis de nanogramos de NGR-TNF, pero no de picogramos, inducen la escisión del receptor de TNF soluble.

Después se investigaron los mecanismos protectores responsables de la curva dosis-respuesta con forma de campana de NGR-mTNF. Debido a que el TNF administrado de manera exógena puede inducir la escisión del receptor de TNF soluble (sTNF-Rs) *in vivo* (21), se planteó la hipótesis de que la eficacia inferior de 10 ng de NGR-TNF estaba relacionada con la inducción de sTNF-R1 y/o sTNF-R2 y, por lo tanto, con la neutralización de su interacción con los receptores de membrana.

Para probar esta hipótesis, se midieron los niveles de sTNF-R1 y sTNF-R2 en el suero de ratones que albergaban tumores recogido 1 hora tras la administración de diversas dosis de mTNF y NGR-mTNF. Como se esperaba, ambos productos indujeron la escisión de sTNF-R2, pero no la escisión de sTNF-R1, a dosis mayores de 4 ng (Fig. 2A).

Para determinar si la escisión de sTNF-R2 regula la actividad de NGR-mTNF, se coadministró esta citocina con mAb 6G1, un anticuerpo antagonista anti-sTNF-R2 que impide la unión de mTNF a TNF-R2 murino soluble y de membrana (16). La actividad anti-tumoral de 10 ng de NGR-mTNF fue potenciada por el mAb 6G1 (Fig. 2B), de acuerdo con la hipótesis de que sTNF-R2 desempeña un papel en la inhibición del efecto anti-tumoral de NGR-mTNF.

Para apoyar adicionalmente esta hipótesis, se comparó la curva dosis-respuesta *in vivo* de NGR-mTNF con la de NGR-hTNF, aprovechando el hecho de que la citocina humana no se puede unir a sTNF-R2 murino (22). Se descubrió que la curva dosis-respuesta de NGR-hTNF no tuvo forma de campana, y que 10 ng de NGR-hTNF es tan activo como 1 ng (Fig. 2C). También es notable que 1 ng fuera suficiente para inducir el máximo efecto anti-tumoral. Esto puede sugerir que la unión del receptor en los vasos se puede conseguir con niveles sanguíneos muy bajos de NGR-hTNF.

En conjunto, los resultados de estos experimentos sugieren claramente que NGR-mTNF y mTNF, a dosis mayores de 4 ng, inducen la escisión de sTNF-R2 en cantidades suficientes para inhibir su actividad anti-tumoral.

## Ejemplo 8 - Las dosis de picogramos de NGR-mTNF son suficientes para aumentar el efecto terapéutico de melfalano y doxorubicina.

Después se investigó si la administración con selección del objetivo de dosis bajas de NGR-mTNF en los vasos tumorales podría aumentar la actividad anti-tumoral de los fármacos antineoplásicos. Estos experimentos se llevaron a cabo en el modelo de B16F1, un melanoma de ratón espontáneo caracterizado por una inmunogenicidad escasa y una sensibilidad baja a melfalano. El melfalano (90 µg) fue incapaz de afectar al crecimiento de los tumores cuando se inyectó solo (Fig. 3A). De forma similar, mTNF (0,1 ng solo, i.p.) fue prácticamente inactivo, aunque la misma dosis de NGR-mTNF retrasó modestamente el crecimiento tumoral (Fig. 3B, paneles superiores). La combinación de melfalano con 0,1 ng de NGR-mTNF indujo efectos anti-tumorales más intensos que los agentes por sí solos, lo que indica un efecto sinérgico (Fig. 3C). Notablemente, la combinación de melfalano con 0,1 ng de NGR-mTNF fue más eficaz que la combinación con 5000 ng de mTNF (Fig. 3C-D). Se observó esta sinergia incluso cuando se inyectó i.v.

NGR-mTNF (0,1 ng) (no mostrado).

5 Se llevaron a cabo dos experimentos similares con doxorubicina en el modelo de B16F1. Los animales se trataron cinco días tras la implantación del tumor, con o sin NGR-mTNF y, 2 horas más tarde, con diversas dosis de doxorubicina (20-320 µg, i.p.). En ambos experimentos, el efecto de doxorubicina más NGR-mTNF fue mayor que el de doxorubicina sola (Fig. 4A, B, E), lo que indica que NGR-mTNF mejora notablemente la eficacia de este fármaco. Por ejemplo, el efecto de doxorubicina (40 µg) más NGR-mTNF (0,1 ng) fue mayor que el de 320 µg de doxorubicina solo (Fig. 4B), mientras el efecto de doxorubicina (20 µg) más NGR-mTNF fue inferior (Fig. 4A). A partir de estos resultados se estimó que la actividad de doxorubicina se ve potenciada 8-10 veces por NGR-mTNF.

10 En conclusión, estos resultados sugieren que las dosis de picogramos de NGR-TNF son suficientes para mejorar la respuesta de los tumores tanto a melfalano como a doxorubicina.

Ejemplo 9 - Las dosis bajas de NGR-mTNF no son tóxicas y no incrementan la toxicidad de melfalano.

15 Para estimar la proporción eficacia/toxicidad de cada tratamiento, se monitorizó el peso corporal de los animales diariamente y la supervivencia de los animales tras el tratamiento. Mientras las dosis terapéuticas de mTNF (10000 ng) indujeron una pérdida notable de peso corporal en animales que albergaban RMA-T (Fig. 1C, izquierda), las dosis terapéuticas de NGR-mTNF (0,01-1 ng) no provocaron una pérdida de peso corporal (Fig. 1C, derecha). Además, ni NGR-mTNF ni mTNF (1 ng cada uno) incrementaron la letalidad de 200 µg de melfalano en ratones que albergaban el tumor RMA-T (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de mTNF y NGR-mTNF sobre la toxicidad de Melfalano (dosis elevada) en ratones que albergaban tumores<sup>a</sup>

Tratamiento	Nº de ratones vivos 3 días tras el tratamiento
Ninguno	5/5 (100%)
Melfalano	7/10 (70%)
Melfalano + mTNF	8/10 (80%)
Melfalano + NGR-mTNF	8/10 (80%)

<sup>a</sup>Se trataron ratones C57BL6, que albergaban tumores de 11 días, (i.p.) con 1 ng de NGR-mTNF o mTNF y, 2 horas más tarde, con 200 µg de melfalano.

20 En el modelo de B16F1, las dosis terapéuticas de NGR-mTNF (0,1 ng) no provocaron una pérdida de peso corporal, incluso cuando se combinaron con melfalano (Fig. 3E). En contraste, el melfalano combinado con dosis terapéuticas de mTNF (5 µg) indujo una pérdida notable de peso corporal (Fig. 3F). Además, NGR-mTNF (0,1 ng) no incrementó la pérdida de peso corporal provocada por las dosis elevadas de doxorubicina (Fig. 4C-D).

25 Estos resultados sugieren que las dosis de picogramos de NGR-mTNF incrementan la respuesta de los tumores a melfalano y doxorubicina sin indicios de toxicidad incrementada.

Ejemplo 10 - La activación de TNF-R1 es necesaria y suficiente para la sinergia entre NGR-TNF y los fármacos antineoplásicos.

Después se investigaron los mecanismos de la sinergia entre las dosis bajas de NGR-mTNF y la quimioterapia.

30 Para determinar si estos mecanismos se basan en la activación de TNF-Rs, se ensayó el efecto del mAb V1q, un anticuerpo neutralizante anti-mTNF, sobre la actividad anti-tumoral de NGR-mTNF (0,1 ng) en combinación con melfalano (90 µg). El mAb V1q inhibió, al menos parcialmente, la actividad anti-tumoral de estos fármacos en el modelo de B16F1 (Fig. 5A). Esto sugiere que la interacción entre el resto de TNF y TNF-Rs es crítica para la actividad del conjugado.

35 Después se estudió el papel de TNF-R1 y TNF-R2. Con este propósito, se estudió el efecto de melfalano en combinación con 0,01 ng o 0,1 ng de NGR-hTNF, un agonista específico de TNF-R1 (22). El efecto de melfalano en el modelo de B16F1 se potenció mediante NGR-hTNF (Fig. 5B), lo que sugiere que la activación de TNF-R1 es suficiente para la sinergia.

Ejemplo 11 - La sinergia entre NGR-TNF y la quimioterapia no depende de la citotoxicidad sobre las células tumorales.

40 Para determinar si la sinergia depende directamente de la citotoxicidad contra las células tumorales, se midió el

efecto de cada compuesto, solo o en combinación, sobre células B16F1 cultivadas. Ni melfalano ni NGR-mTNF, solos o en combinación, destruyó estas células en un ensayo *in vitro* de 48 horas (no mostrado). De forma similar, NGR-mTNF no aumentó la actividad citotóxica de doxorubicina *in vitro* (no mostrado). Estos resultados sugieren que la sinergia observada *in vivo* no depende directamente de los efectos citotóxicos contra las células tumorales, y apunta a un papel indirecto de un componente del estroma tumoral, p.ej. el recubrimiento endotelial de los vasos tumorales.

Ejemplo 12 - NGR-TNF incrementa la penetración de doxorubicina en los melanomas y linfomas murinos.

Después se investigó si NGR-mTNF podría incrementar la penetración de los fármacos antineoplásicos en los tumores. Con este propósito se midió la cantidad de doxorubicina que había penetrado en los tumores B16F1 y RMA-T, 2 horas tras la administración, aprovechando las propiedades fluorescentes de este fármaco (23). Los experimentos preliminares demostraron que los núcleos de las células B16F1 se hacen fluorescentes después de exponer a estas células a doxorubicina *in vitro* (Fig. 6A). La señal de fluorescencia depende de la dosis y es estable durante al menos 24 horas, cuando las células se fijan con formaldehído y se mantienen a 4 °C, tal como se mide mediante FACS (Fig. 6B). Así, la intensidad de fluorescencia de las células tumorales recuperadas de los animales tras el tratamiento es una indicación de la cantidad de doxorubicina que ha penetrado en los tumores. Se observó que 0,1 ng de NGR-mTNF, administrados 2 horas antes de doxorubicina, incrementaron la intensidad de fluorescencia y el porcentaje de células positivas recuperadas de ambos tumores B16F1 y RMA-T, 2 horas tras el tratamiento (2-5 veces, Fig. 6C-H). Esto sugiere que NGR-mTNF incrementó el número de células que alcanzó doxorubicina, así como la cantidad intracelular de fármaco.

Ejemplo 13 - Efecto de RGD-TNF sobre los tumores

Se trataron ratones C57/BL6 que albergaban tumores RMA-T (5 ratones/grupo) de manera intraperitoneal con melfalano solo, o en combinación con RGD-TNF o NGR-TNF. El efecto sobre el volumen tumoral se muestra en la Fig. 8A, y el efecto sobre el peso de los animales se muestra en la Fig. 8B. Estos resultados demuestran que RGD-TNF también es activo en el intervalo de picogramos.

Ejemplo 14 - Efecto de IFN $\gamma$ -NGR sobre los tumores

Se trataron ratones C57/BL6 que albergaban linfomas RMA con o sin IFN $\gamma$  (3 ng) o IFN $\gamma$ -NGR (3 ng). Después de 21 días los animales se sacrificaron. Los resultados de volumen tumoral y de pérdida de peso de los animales se pueden observar en las Figs. 9A y 9B. Además, se trataron ratones C57/BL6 que albergaban linfomas RMA con o sin IFN $\gamma$  (3 ng), IFN $\gamma$ -NGR (3 ng), IFN $\gamma$ -NGR (3 ng) más mAb anti-CD13 R3-63 (25  $\mu$ g) o IFN $\gamma$ -NGR (3 ng) más mAb 19E12 (50  $\mu$ g). El mAb 19E12 es una IgG irrelevante usada como control negativo en el experimento. Los resultados demuestran que IFN $\gamma$ -NGR es activo en el intervalo de picogramos.

Ejemplo 15 - Las dosis de picogramos de NGR-TNF son suficientes para aumentar el efecto terapéutico de cisplatino

Se investigó si la administración con selección del objetivo de dosis bajas de NGR-TNF a vasos tumorales podría aumentar la actividad anti-tumoral del fármaco anti-neoplásico cisplatino. Estos experimentos se llevaron a cabo en ratones C57/BL6/N que albergaban tumores RMA-T de una edad inicial de 8 semanas. Los ratones se trataron con o sin cisplatino o NGR-mTNF con tratamiento en el día 10. Los resultados se muestran en la Fig. 10. En esta figura, Cys = disolución de Cisplatino Teva de 0,5 mg/ml; NGR = NGR-mTNF. El diluyente fue HAS de 100 mg/ml en NaCl del 0,9%. Los resultados sugieren que las dosis de picogramos de NGR-TNF son suficientes para aumentar el efecto terapéutico del cisplatino.

#### Sumario de Ventajas

La alteración de la permeabilidad vascular y la presión intersticial, el daño de las células endoteliales y el depósito de fibrina son mecanismos importantes para la actividad anti-tumoral de TNF, solo o en combinación con fármacos antineoplásicos. Tras la infusión en animales o pacientes, TNF puede inducir también mecanismos de retroinhibición que neutralizan la mayoría de estos efectos. Por ejemplo, TNF, incluso a dosis moderadas, puede inducir la liberación de los receptores de TNF p55 y p75 solubles, lo que puede impedir su interacción con los receptores de membrana (21, 24). Aunque estos inhibidores solubles pueden proteger al organismo de los efectos dañinos de esta citocina, también pueden impedir su actividad anti-tumoral y podrían explicar, en parte, la necesidad de dosis elevadas de TNF para una terapia eficaz. En este trabajo se postula que dirigir dosis bajas de TNF hacia los vasos tumorales representa una estrategia nueva para evitar las reacciones tóxicas así como los mecanismos de retroinhibición, a la vez que se conserva la sinergia con la quimioterapia. Para verificar esta hipótesis, se ha investigado la actividad anti-tumoral de dosis elevadas y bajas de NGR-mTNF y mTNF, que oscilan desde cantidades de picogramos a microgramos, en dos modelos murinos basados en el linfoma RMA-T subcutáneo y el melanoma B16F1. El estudio se llevó a cabo mediante el uso de estas citocinas solas o en combinación con melfalano o doxorubicina. Aunque mTNF fue prácticamente inactivo en estos modelos a dosis menores de 100-1000 ng, se descubrió que NGR-mTNF, incluso solo, podría inducir efectos anti-tumorales con dosis tan bajas como 0,01-0,1 ng. Debido a que los valores de DL<sub>50</sub> de mTNF y NGR-mTNF son similares y corresponden a alrededor de 50.000 ng en los ratones que albergaban tumores RMA-T (14), estos resultados indican que la proporción eficacia/toxicidad de NGR-mTNF es 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> veces mayor que la de mTNF.

La administración de cantidades mínimas de NGR-mTNF (0,1 ng) a animales que albergaban tumores potenció la actividad anti-tumoral de melfalano y doxorubicina sin indicios de toxicidad incrementada, tal como se determina mediante la reducción de la masa tumoral, la supervivencia de los animales y la pérdida de peso tras el tratamiento. Esto sugiere que NGR-mTNF mejora el índice terapéutico de estos fármacos. Es notable que fueran necesarias dosis mayores de  $5 \times 10^4$  veces de mTNF para aumentar el efecto de melfalano a niveles comparables, lo que provocó una pérdida notable de peso corporal.

El hecho de que tanto melfalano como doxorubicina a dosis prácticamente inactivas en el modelo de B16F1 redujeran el crecimiento tumoral cuando se combinaron con NGR-mTNF indica que estos fármacos actúan de manera sinérgica. Los estudios sobre el mecanismo de acción demostraron que la sinergia se basa en la interacción de NGR-mTNF con TNF-R1 en las células del estroma, muy probablemente las células endoteliales, y mucho menos en las células tumorales. Además, se descubrió que la selección del objetivo vascular con NGR-mTNF mejora la penetración de los fármacos citotóxicos en los tumores. De manera notable, NGR-mTNF incrementó tanto el porcentaje de células cancerosas que pueden ser alcanzadas por doxorubicina en 2 horas como la cantidad intracelular de fármaco, lo que sugiere que NGR-TNF puede alterar las barreras de penetración de fármacos. Los estudios previos demostraron que TNF puede incrementar rápidamente la permeabilidad endotelial (25, 26), y puede disminuir la presión del fluido intersticial (8), que se cree que son barreras importantes para la penetración de fármacos en los tumores (1). Posiblemente, estos mecanismos incrementan el transporte convectivo de fármacos a través de la pared de los vasos tumorales y del intersticio, lo que da como resultado finalmente una absorción de fármacos incrementada por las células tumorales. El momento de la administración probablemente es crítico para estos mecanismos, ya que TNF puede inducir también la coagulación intravascular (27), que conduce a la oclusión del vaso y la reducción de la perfusión del tumor. Según este punto de vista, se observó que el efecto de melfalano fue mayor cuando este fármaco se administró 2 horas después de NGR-TNF, que después de 6 horas (datos no mostrados).

La hipótesis de que la selección del objetivo vascular podría evitar los mecanismos de retroinhibición, normalmente asociados a la terapia con TNF, está respaldada por la observación de que las dosis de picogramos de NGR-mTNF no inducen la escisión de receptores solubles, mientras que tanto NGR-mTNF como mTNF inducen rápidamente la liberación de sTNF-R2 en la circulación a dosis mayores de 4-10 ng. Estos niveles de sTNF-R2 inhibieron la mayor parte de la actividad anti-tumoral de 10 ng de NGR-mTNF y pueden explicar la observación paradójica de que 10 ng son menos activos que 0,1 ng. Probablemente, una gran proporción de las moléculas inyectadas fueron complejadas rápidamente por sTNF-Rs y su actividad se bloqueó.

Se han dilucidado parcialmente los mecanismos moleculares subyacentes en la interacción selectiva de dosis bajas de NGR-mTNF con los vasos sanguíneos tumorales. Se ha demostrado recientemente que se expresan diferentes isoformas de CD13 en los vasos asociados a tumores, en los epitelios y en las células mieloides, y que el dominio NGR de NGR-TNF reconoce selectivamente una isoforma de CD13 asociada a los vasos tumorales (28). Se realiza la hipótesis, por lo tanto, de que los niveles sanguíneos bajos de NGR-mTNF pueden interaccionar rápidamente con las células endoteliales CD13-positivas debido a una unión multivalente de elevada avidéz que implica tanto CD13 como TNF-Rs, y poco o nada con las células endoteliales CD13-negativas de los vasos normales, debido a una avidéz inferior. Se muestra una representación esquemática de estos conceptos y de las interacciones hipotéticas de NGR-TNF con los receptores solubles y de membrana en la Fig. 7.

También se ha descubierto que RGD-TNF e IFN $\gamma$ -NGR son activos en el intervalo de picogramos. También se ha demostrado que NGR-TNF incrementa el efecto del cisplatino.

En conclusión, se ha descubierto que la administración con selección del objetivo de dosis de picogramos de citocinas a los vasos tumorales aumenta la actividad anti-tumoral de los fármacos antineoplásicos en ratones sin inducir una escisión de receptores solubles. Dado que se espera que el motivo CNGRC seleccione como objetivo los vasos asociados a tumores murinos y humanos (29), los resultados sugieren que la combinación de dosis bajas de citocinas con selección del objetivo con fármacos anti-neoplásicos podría incrementar su índice terapéutico en pacientes humanos.

Las diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistema descritos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica. Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas específicas, se debería entender que la invención tal como se reivindica no se debería limitar excesivamente a tales realizaciones específicas.

De hecho, las diversas modificaciones de los modos descritos de llevar a cabo la invención que son evidentes para los expertos en biología molecular o los campos relacionados pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

## Referencias

1. Jain, R.K. 1994. *Sci Am.* 271:58-65.
2. Lienard, D., et al. 1992. *J. Clin. Oncol.* 10:52-60.
3. Eggermont, A.M., et al. 1996. *J. Clin. Oncol.* 14:2653-2665.
- 5 4. Lejeune, F.J. 1995. *Eur. J. Cancer.* 31A:1009-1016.
5. Fraker, D.L., et al. 1996. *J. Clin. Oncol.* 14:479-489.
6. Rossi, C.R., et al. 1999. *Cancer.* 86:1742-1749.
7. van der Veen, A.H., et al. 2000. *Br. J. Cancer.* 82:973-980.
8. Kristensen, C.A., et al. 1996. *Br. J. Cancer.* 74:533-536.
- 10 9. Suzuki, S., et al. 1990. *Int. J. Cancer.* 46:1095-1100.
10. de Wilt, J.H., et al. 2000. *Br. J. Cancer.* 82:1000-1003.
11. Fiers, W. 1995. Biologic therapy with TNF: preclinical studies. En *Biologic therapy of cancer: principles and practice.* V. De Vita, S. Hellman, y S. Rosenberg, editores. J.B. Lippincott Company, Filadelfia. 295-327.
- 15 12. Fraker, D.L., H.R. Alexander, y H.I. Pass. 1995. Biologic therapy with TNF: systemic administration and isolation-perfusion. En *Biologic therapy of cancer: principles and practice.* V. De Vita, S. Hellman y S. Rosenberg, editores. J.B. Lippincott Company, Filadelfia 329-345.
13. Corti, A., y F. Marcucci. 1998. *J. Drug Targ.* 5:403-413.
14. Curnis, F., et al. 2000. *Nat. Biotechnol.* 18:1185-1190.
15. Moro, M., et al. 1997. *Cancer Res.* 57:1922-1928.
- 20 16. Corti, A., et al. 1999. *Infect Immun.* 67:5762-5767.
17. Pelagi, M., et al. 2000. *Eur. Cytokine Net.* 11:580-588.
18. Corti, A., et al. 1994. *J. Immunol. Meth.* 177:191-198.
19. Smith, R.A., y C. Baglioni. 1987. *J. Biol. Chem.* 262:6951-6954.
20. Gasparri, A., et al. 1999. *Cancer Res.* 59:2917-2923.
- 25 21. Aderka, D., et al. 1998. *J. Clin. Invest.* 101:650-659.
22. Tartaglia, L.A., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9292-9296.
23. Luk, C.K., y I.F. Tannock. 1989. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:55-59.
24. Sella, A., et al. 1995. *Cancer Biother.* 10:225-235.
25. Brett, J., et al. 1989. *J. Exp. Med.* 169:1977-1991.
- 30 26. Goldblum, S.E., y W.L. Sun. 1990. *Am. J. Physiol.* 258:L57-67.
27. Clauss, M., et al. 1992. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by TNF: insights into the role of endothelium in the host response to inflammatory stimuli. En *Tumour necrosis factors: the molecules and their emerging roles in medicine.* B. Beutler, editor, Raven Press, Nueva York. 49-63.
28. Curnis, F., et al. 2002. *Cancer Res.*:62:867-874.
- 35 29. Arap, W., et al. 1998. *Science.* 279:377-380.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de una citocina y al menos un resto de selección como objetivo de un tumor (TTM) que contiene el motivo NGR o el motivo RGD y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer, en la que el conjugado está presente en una cantidad para proporcionar una dosis en el intervalo de 0,5 a 500 ng/kg, y en la que la citocina es TNF o IFN $\gamma$ .
2. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 1, en la que el conjugado está presente en una cantidad para proporcionar una dosis en el intervalo de 1 a 50 ng/kg.
- 10 3. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 2, en la que el conjugado está presente en una cantidad para proporcionar una dosis en el intervalo de 5 a 15 ng/kg.
4. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 1, en la que el conjugado está presente en una cantidad de forma que el conjugado, o un metabolito del mismo, se proporciona al plasma sanguíneo de un paciente a tratar en una cantidad no mayor de alrededor de 35.000 ng/día para un paciente de 70 kg.
- 15 5. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquier reivindicación precedente, en la que la citocina es TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ .
6. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquier reivindicación precedente, en la que el TTM es un resto de selección como objetivo de la vasculatura tumoral (TVTM).
- 20 7. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 6, en la que la TVTM es una molécula de unión de un receptor, marcador u otro componente extracelular de la vasculatura tumoral.
8. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el TTM es una molécula de unión de un receptor tumoral, marcador u otro componente extracelular.
- 25 9. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquier reivindicación precedente, en la que el TTM contiene el motivo NGR.
10. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 9, en la que el TTM es CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cicloCVLNGRMEC, CNGRC lineal o cíclico.
- 30 11. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquier reivindicación precedente, en la que el TTM selecciona como objetivo una aminopeptidasa N (CD13), integrina  $\alpha\beta 3$  o integrina  $\alpha\beta 5$ .
12. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquier reivindicación precedente, en la que la citocina está unida a dicho TTM por medio de un espaciador.
- 35 13. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 12, en la que dicho espaciador es un único aminoácido, una secuencia de aminoácidos o un residuo orgánico.
14. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 12, en la que la citocina es TNF y el TTM es CNGRC, y en la que el TNF está unido al CNGRC por medio del espaciador G (glicina).
- 40 15. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquier reivindicación precedente, en la que el conjugado está en forma de una proteína de fusión.
16. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el conjugado está en forma de un ácido nucleico que codifica dicha citocina y TTM.
- 45 17. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según cualquier reivindicación precedente, en la que la composición comprende además otro agente antitumoral o un compuesto de formación de imágenes para el diagnóstico de tumores.
18. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento o el diagnóstico del cáncer según la reivindicación 17, en la que el agente antitumoral adicional es doxorrubicina, melfalano o cisplatino.

FIGURA 1

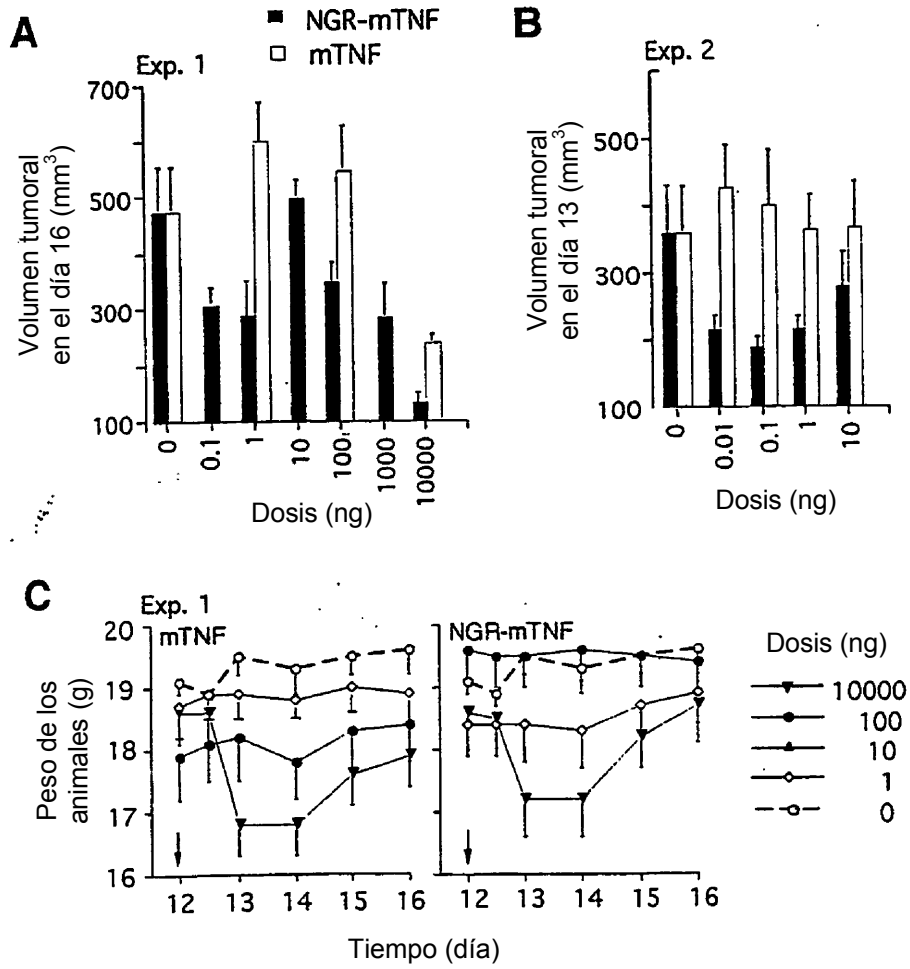




FIGURA 2

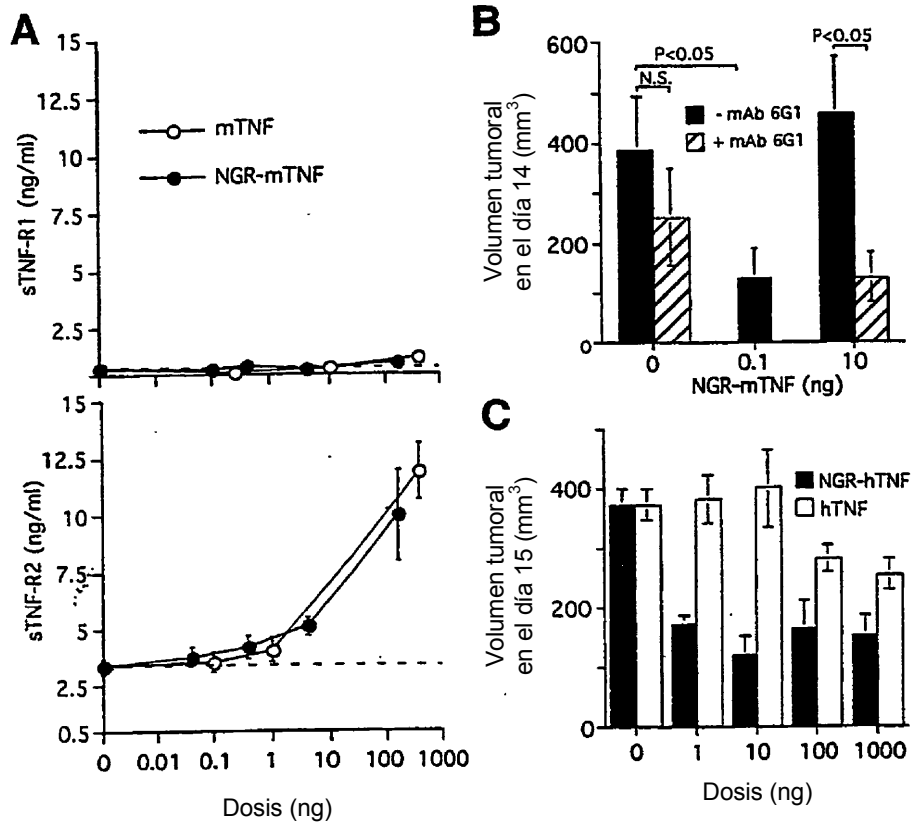


FIGURA 3

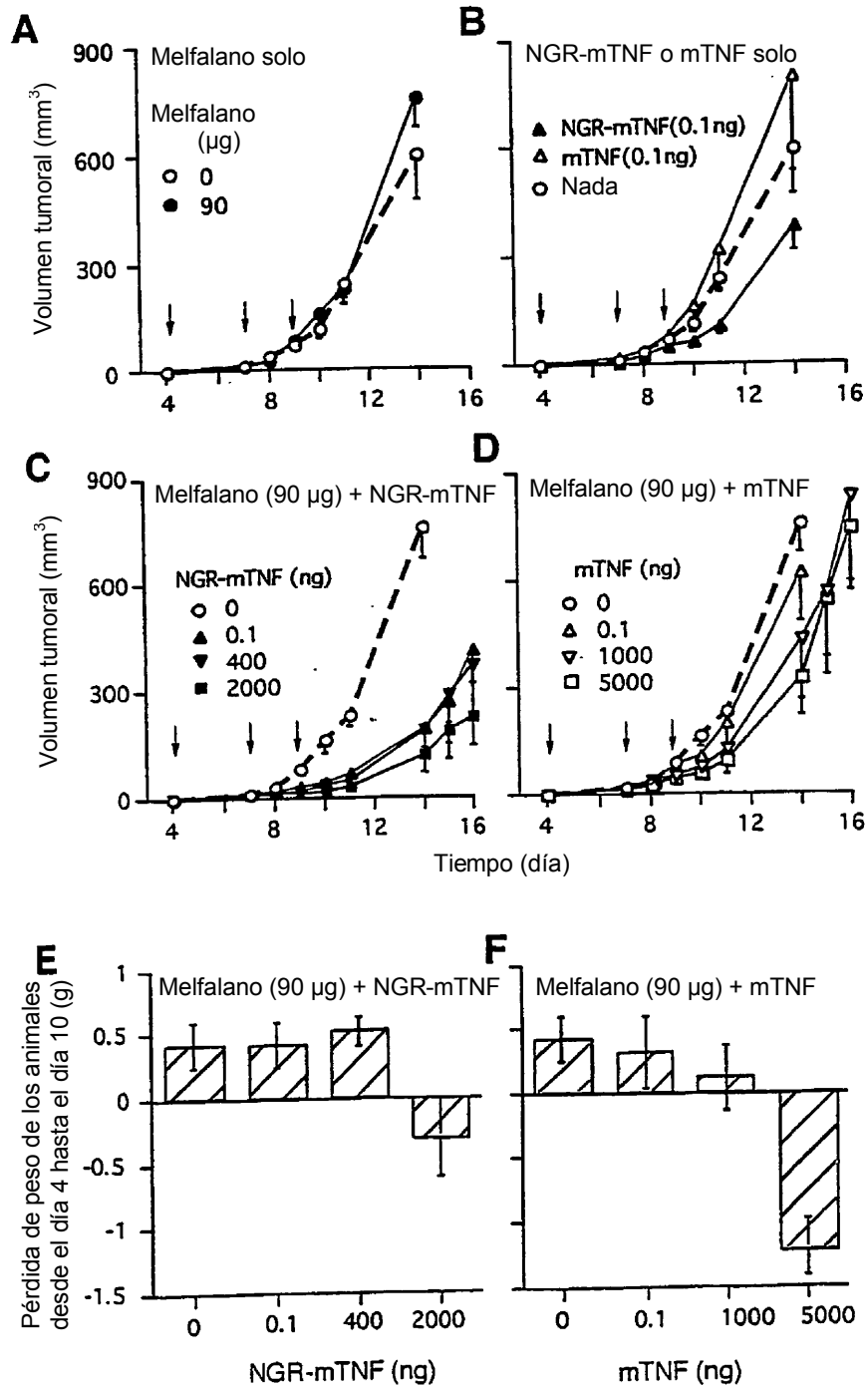


FIGURA 4

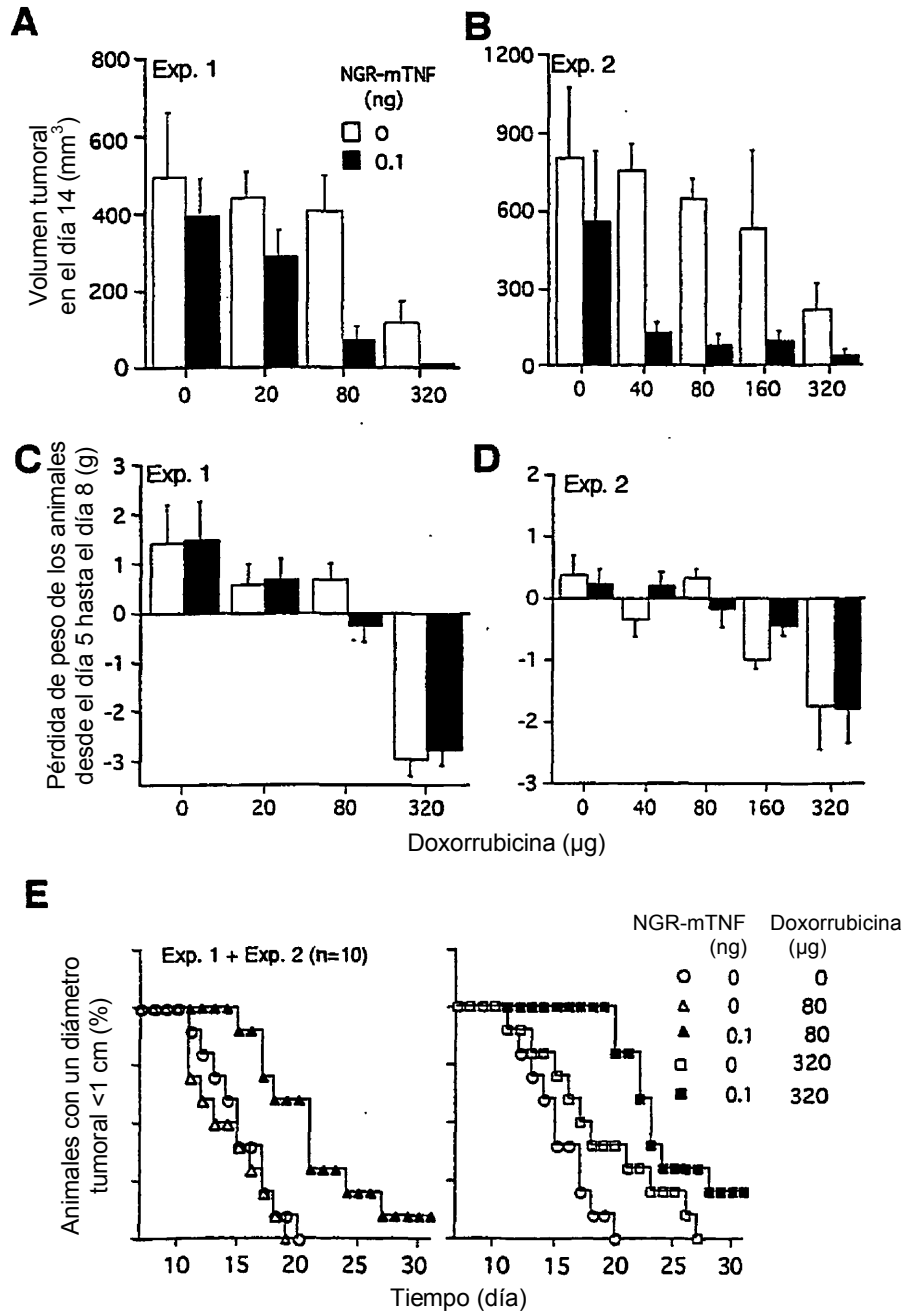


FIGURA 5

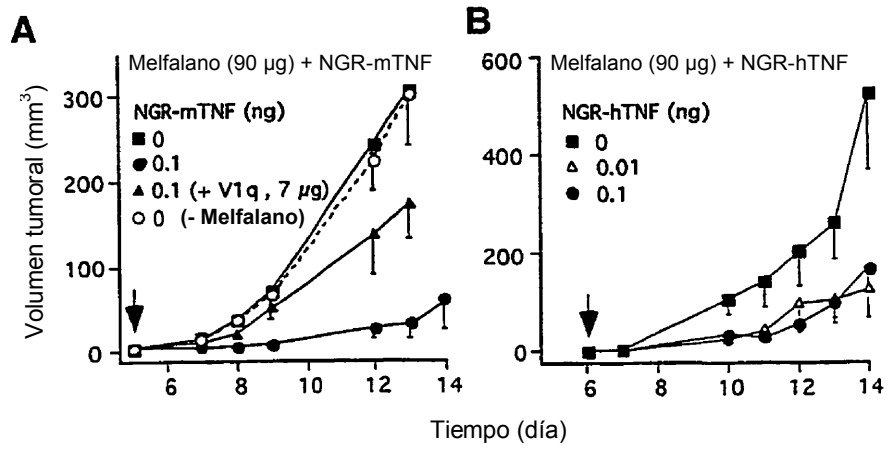


FIGURA 6

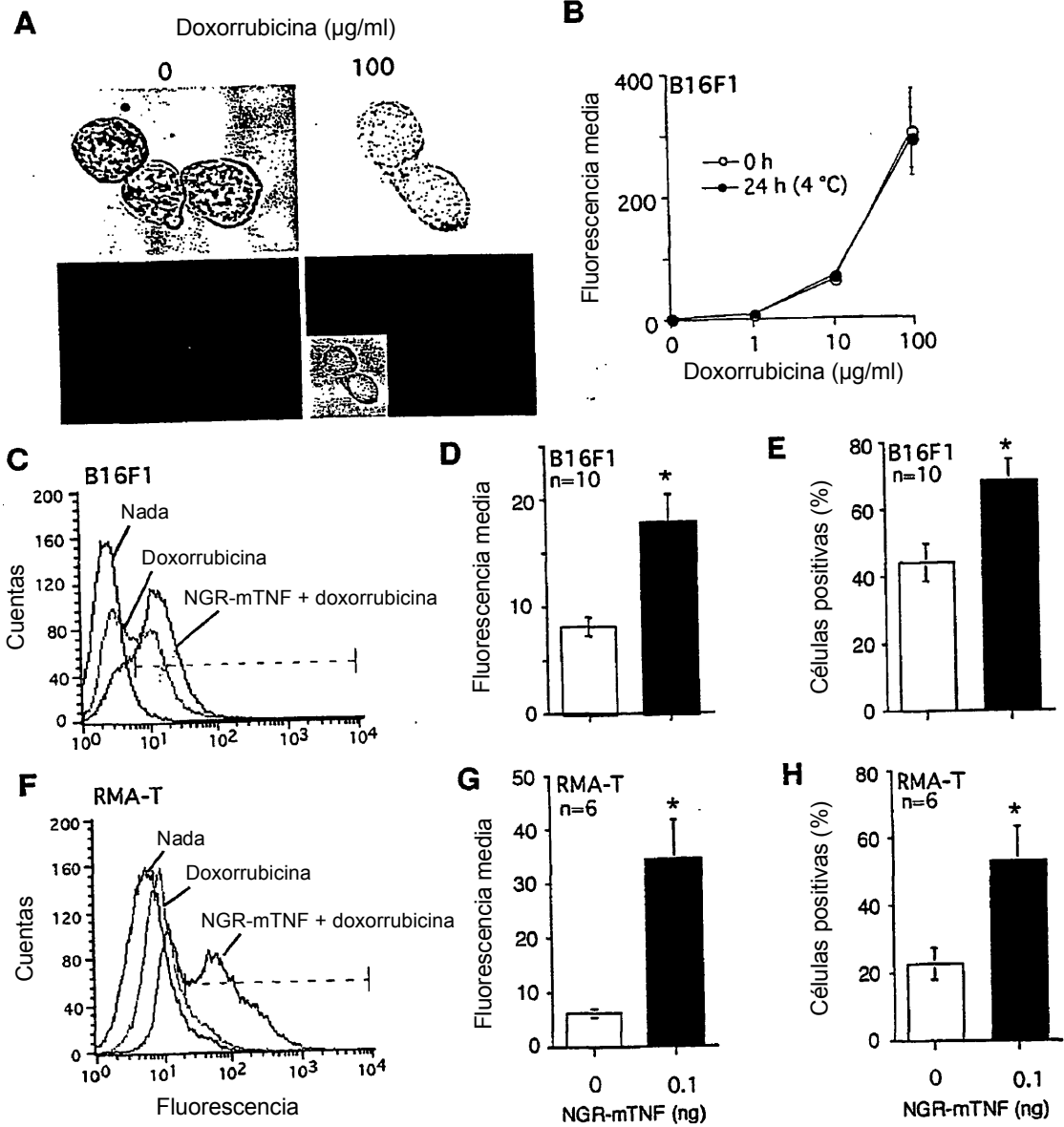


FIGURA 7

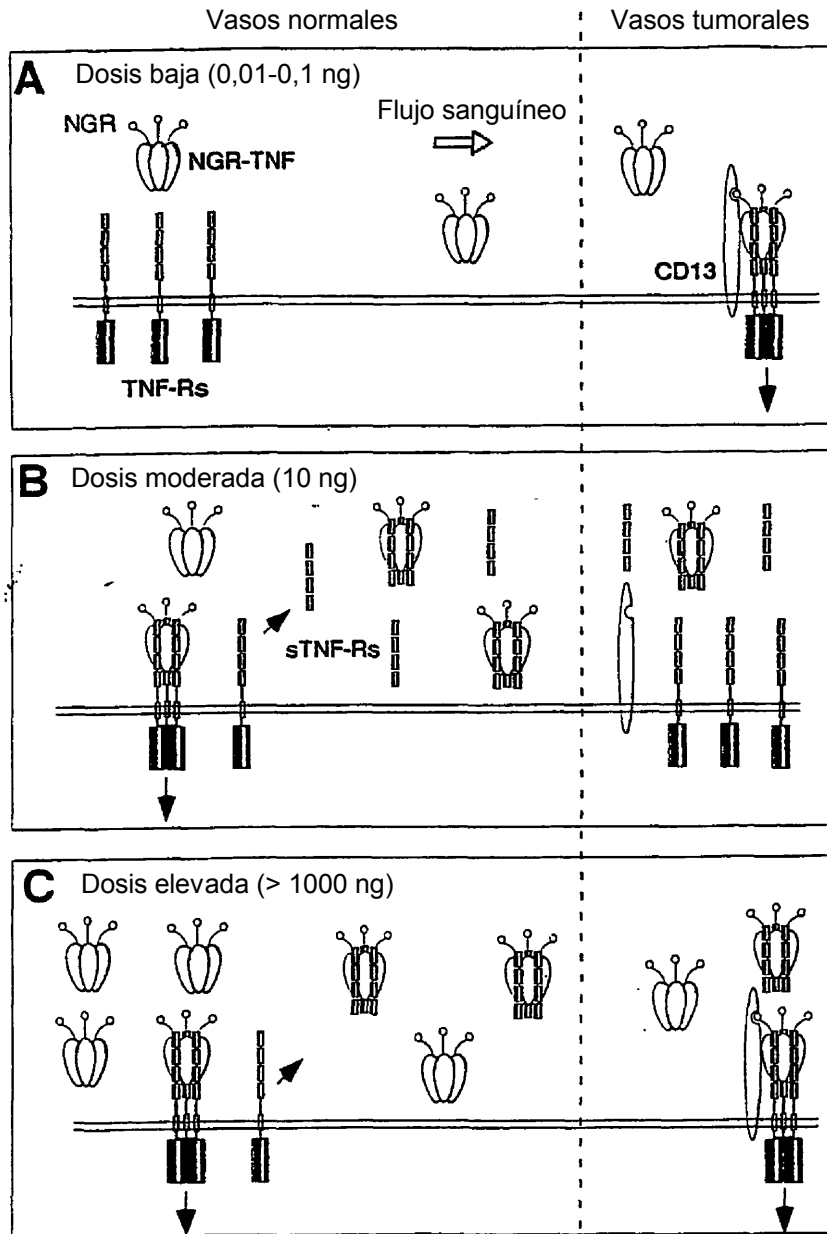


FIGURA 8

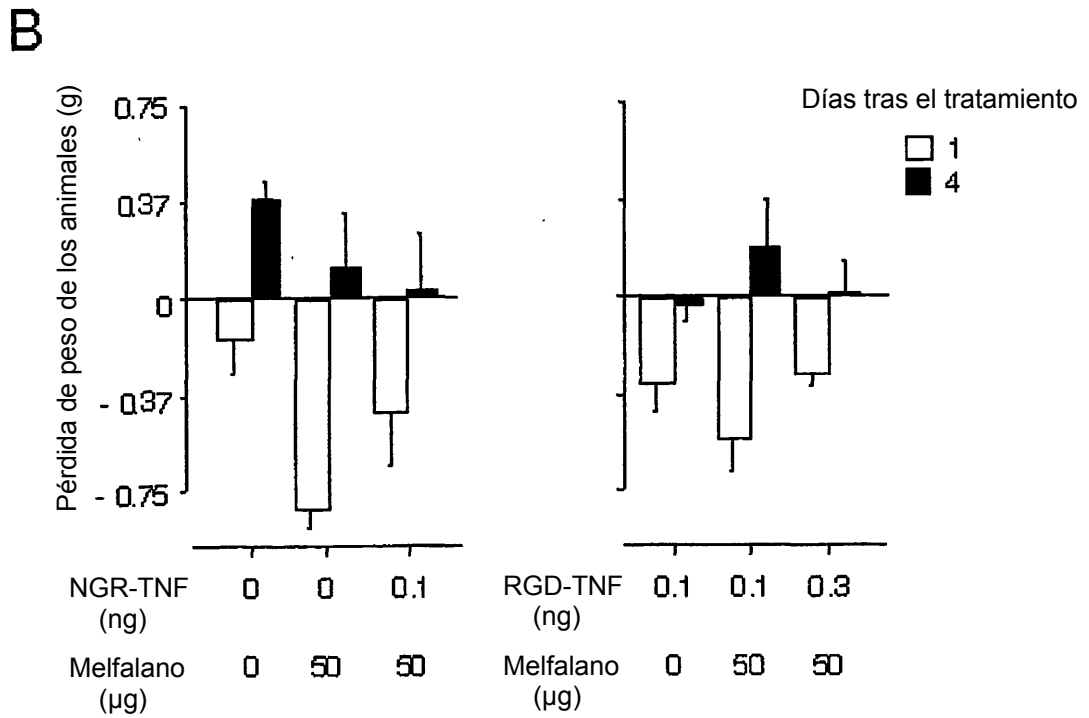
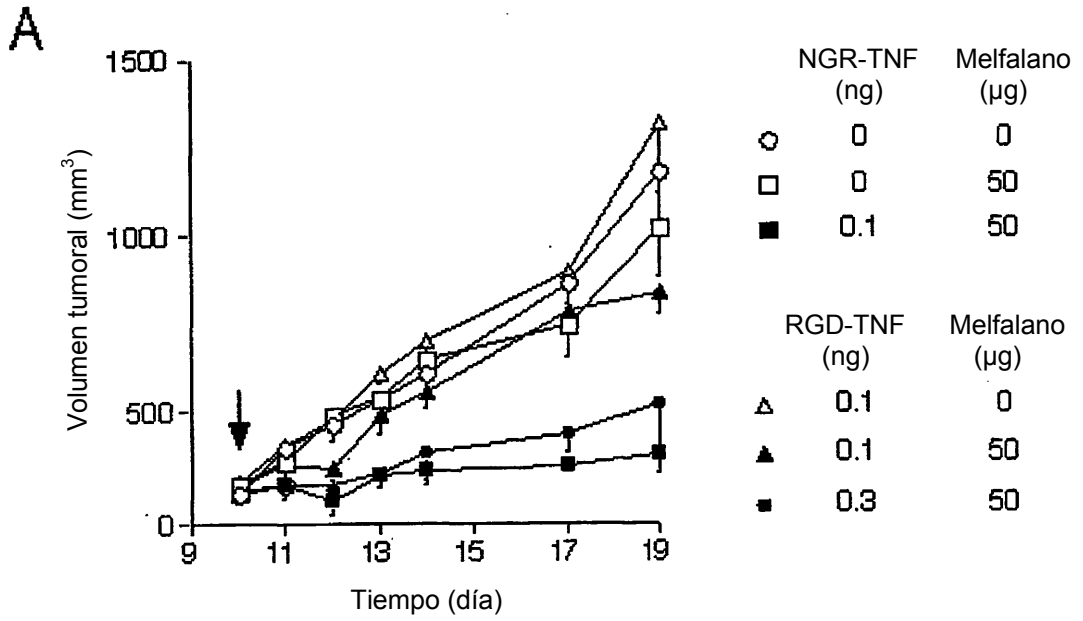


FIGURA 9

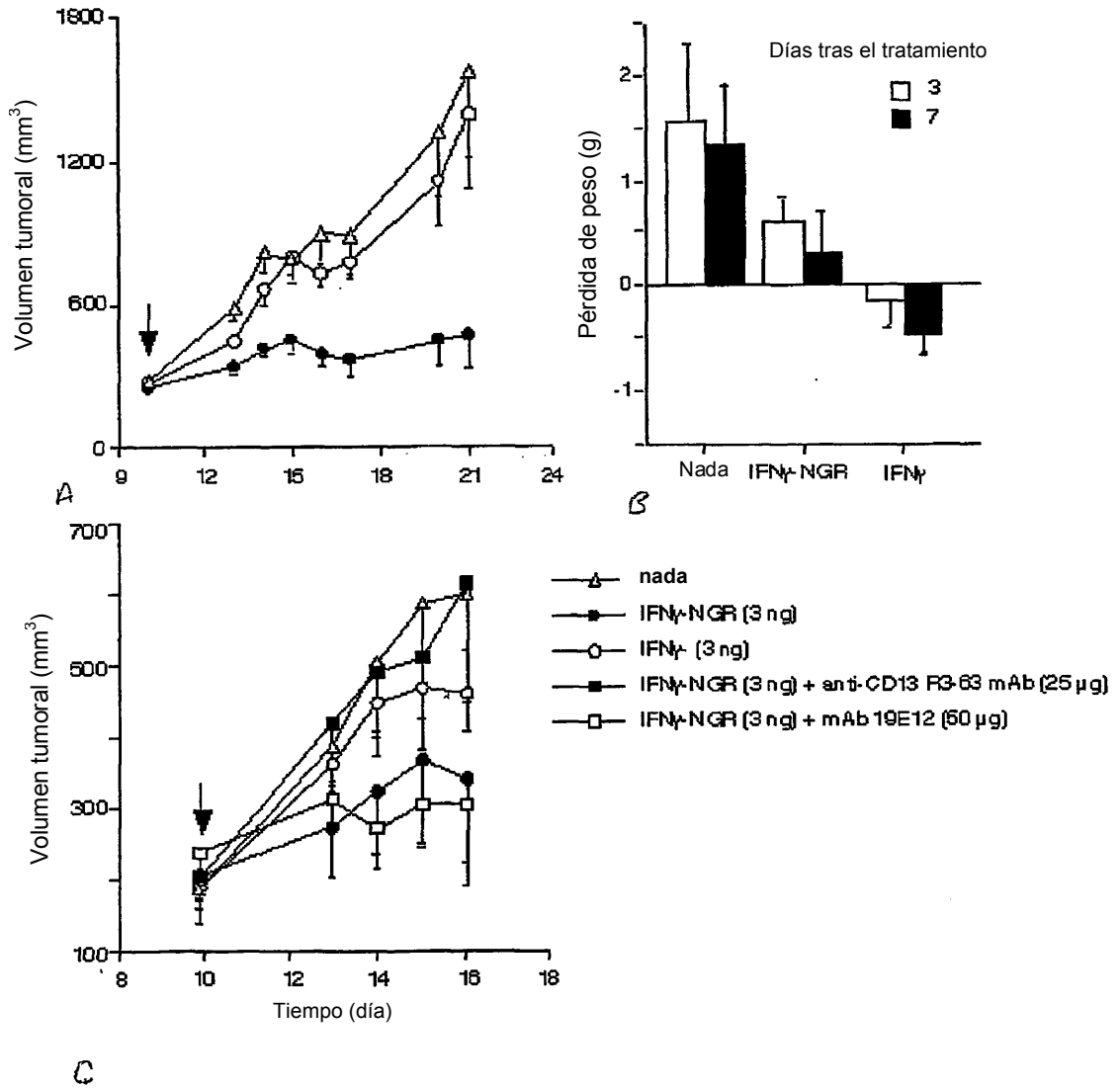




FIGURA 10

