

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 743**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/EP2012/062073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13010749**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12735231 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2734232**

54 Título: **Terapia secuencial con anti-CTLA-4 e IL-2 dirigida**

30 Prioridad:

**19.07.2011 EP 11005902**

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

**06.03.2018**

73 Titular/es:

**PHILOGEN S.P.A. (50.0%)**

**Via Bellaria 35**

**53018 Sovicille (SI), IT**

72 Inventor/es:

**SCHWAGER, KATHRIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 657 743 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Terapia secuencial con anti-CTLA-4 e IL-2 dirigida

- 5 La presente invención se refiere al tratamiento de tumores malignos usando un enfoque terapéutico combinado. La invención hace uso de anticuerpos de direccionamiento vascular fusionados con IL-2 y de anticuerpos anti-CTLA-4. Según la invención, los anticuerpos se administran de manera secuencial a un sujeto.

## Introducción

- 10 El antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4), que es un regulador negativo consolidado de la respuesta de células T y también se conoce como CD152, es crítico para el mantenimiento de la homeostasis de células T y la autotolerancia. Los mecanismos por los que CTLA-4 ejerce su función inhibidora inmunitaria tienen múltiples facetas y pueden producirse directamente por medio de células T efectoras convencionales o indirectamente por medio de células T reguladoras.

- 15 CTLA-4 es homólogo a la molécula coestimuladora CD28 y comparte los mismos ligandos, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), que se expresan en la superficie de células que presentan antígenos (APC). Sin embargo, la unión diferencial de CD80/CD86 en APC a CD28 y CTLA-4 en células T efectoras conduce a resultados opuestos, desencadenando CD28 la activación de células T y provocando CTLA-4 la inhibición de células T. Un mecanismo por el que CTLA-4 puede inducir la inhibición de células T implica el reclutamiento de las fosfatasa SHP-1 y PP2A en la vecindad del TCR en la sinapsis inmunitaria. Este reclutamiento puede dar como resultado la desfosforilación de las moléculas de señalización dentro del complejo TCR y la consiguiente terminación de activación de células T.

- 20 La inmunoterapia contra el cáncer se basa en la capacidad del sistema inmunitario para seleccionar como diana antígenos específicos de tumores para generar una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inicial requiere tanto la unión del péptido de antígeno/MHC al complejo de receptor de células T como una segunda señal coestimuladora creada por la unión de CD28 en la célula T con B7 ubicado en la célula que presenta antígeno (Sharpe, A. H. y Abbas, A. K. (2006) *N Engl J Med*, 355, 973-975.). Los puntos de control regulatorios, tales como antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4), sirven para atenuar esta señal, evitando así la autoinmunidad. CTLA-4 proporciona una potente señal inhibidora a la respuesta inmunitaria que atenúa la activación de linfocitos (Ribas, A. (2007) *Update Cancer Ther*, 2, 133-139; Walunas, *et al.*, (1994) *Immunity*, 1, 405-413).

- 25 Su función clave en la regulación del sistema inmunitario ha convertido a CTLA-4 en una diana terapéutica atractiva para el cáncer, con el desarrollo de anticuerpos monoclonales completamente humanos que bloquean CTLA-4. Los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 tales como ipilimumab dan como resultado el bloqueo de la señalización de CTLA-4, prolongando así la activación de células T, restableciendo la proliferación de células T y, por tanto, amplificando la inmunidad mediada por células T (Peggs *et al.*, (2007) *Update Cancer Ther*, 2, 133-139). Datos preclínicos prometedores en modelos de ratón condujeron a la investigación de dos anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 completamente humanos en pacientes con melanoma avanzado. Se han investigado tremelimumab (un anticuerpo IgG2) e ipilimumab (un anticuerpo IgG1) en ensayos de fase II y III en pacientes con melanoma metastásico. La FDA aprobó el ipilimumab en marzo de 2011 como tratamiento de segunda línea para melanoma avanzado.

- 30 Los compuestos se administraron o bien como monoterapia o bien en combinación con vacunas de péptidos, quimioterapia con dacarbacina o siguiendo estrategias de vacunación de células completas. Estos ensayos lograron resultados alentadores inicial del 6-21% de tasas de respuesta clínica. Sin embargo, se observaron toxicidades inflamatorias de grado III y IV.

- 35 La interleucina-2 (IL-2), una citocina proinflamatoria de haz de cuatro hélices alfas (documento WO01/062298) producida por células T cooperadoras 1, juega un papel esencial en las fases de activación de tanto respuestas inmunitarias específicas como naturales (Taniguchi *et al.* *Cell* 73: 5-8, 1993). IL-2 promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B activados y de linfocitos citolíticos naturales (NK), e induce la actividad de células T citotóxicas (CTL) y NK/linfocito citolítico activado por linfocinas (LAK). IL-2 se ha usado en enfoques de inmunoterapia de varios tumores humanos (Rosenberg J. *Clin. Oncol.* 10: 180-199, 1992). La administración de IL-2 recombinante (rIL2) solo o en combinación con células linfoides transferidas adoptivamente ha dado como resultado la regresión de tumores establecidos en tanto modelos animales como pacientes.

- 40 Sin embargo, su eficacia terapéutica *in vivo* está limitada por su rápida eliminación y, a altas dosis, por una toxicidad grave relacionada principalmente con un síndrome de permeabilidad vascular (Siegel y Puri, (1991) *J. Clin. Oncol.* 9: 694-704). El suministro de IL-2 al sitio tumoral por medio de un anticuerpo dirigido contra un marcador de tumores de la superficie celular puede permitir conseguir concentraciones locales activas de IL-2, así como reducir toxicidades asociadas con la administración sistémica (Lode *et al.* *Pharmacol. Ther.* 80: 277-292, 1998).

- 45 El anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab se ha combinado con IL-2 de alta dosis en un estudio de fase I/II. Hubo 8 pacientes con respuesta objetiva (3 completas y 5 parciales) de 36 pacientes (22%). Los autores concluyeron que

estos datos no parecían respaldar un efecto sinérgico de IL-2 y anticuerpos anti-CTLA-4, puesto que el tratamiento con cualquiera de los agentes solos podía obtener la tasa de respuesta observada, o bien podía ser un efecto aditivo (Maker, *et al.*, (2005) *Ann Surg Oncol*, 12, 1005-1016.). Ipilimumab se comercializa por BMS como Yervoy, y está aprobado para el melanoma.

5 Está disponible otro anticuerpo anti-CTLA-4, tremelimumab (Pfizer). Este anticuerpo está en desarrollo para el melanoma y otros cánceres.

10 El anticuerpo L19, específico para el extradominio B alternativamente empalmado de fibronectina (EDB), un marcador de angiogénesis (documento WO99/058570) (Neri, D. y Bicknell, R. (2005) *Nat Rev Cancer*, 5, 436-446; Schliemann, C. y Neri, D. (2007) *Biochim Biophys Acta*, 1776, 175-192) es uno de los agentes de direccionamiento vascular más validado, habiéndose estudiado solo y como anticuerpo derivado en muchos estudios de biodistribución y terapia, en modelos animales de cáncer y en pacientes (Santimaria, *et al.* (2003) *Clin Cancer Res*, 9, 571-579; Sauer, *et al.* (2009) *Blood*, 113, 2265-2274).

15 L19-IL2 es una proteína de fusión recombinante compuesta por el fragmento de anticuerpo humano scFv(L19) fusionado a IL-2 humana. IL-2 recombinante, o Proleukin™ (Novartis), se ha aprobado en la UE para el tratamiento de carcinoma de células renales (RCC) y en los Estados Unidos para el tratamiento de RCC y melanoma. La potencia de L19-IL2 es equivalente a la potencia de IL-2.

20 El rendimiento terapéutico de L19-IL2 se ha sometido a prueba de manera extensiva en diversos modelos de ratón de cáncer, incluyendo tumores de páncreas y de hígado trasplantados (modelos "ortotópicos") (Carnemolla, *et al.*, (2002) *Blood*, 99, 1659-1665, Menrad, A. y Menssen, H. D. (2005) *Expert Opin Ther Targets*, 9, 491-500, Schliemann, *et al.*, (2009) *Blood*, 113, 2275-2283, Wagner, *et al.*, (2008) *Clin Cancer Res*, 14, 4951-4960). En modelos de roedor, L19-IL2 presentó una captación preferencial alrededor de vasos sanguíneos recién formados, con razones de tumor con respecto a sangre de hasta 30 con respecto a 1 tan pronto como 24 horas tras la inyección mientras que IL-2 fusionado a anticuerpos de especificidad irrelevante no presentaron una captación preferencial en la masa tumoral (Carnemolla, *et al.*, (2002) *Blood*, 99, 1659-1665).

25 L19-IL2 se está investigando actualmente en ensayos clínicos de fase I y II para diferentes tumores malignos (Johannsen, *et al.* (2010) *Eur J Cancer*, 46, 2926-2935) con un enfoque principal en melanoma metastásico.

30 De manera similar a L19-IL2, se han desarrollado otras inmunocitocinas basadas en IL-2. F16-IL2 está compuesto por el anticuerpo humano F16 en formato scFv fusionado a IL-2 (documento WO06/050834). F16 se une al dominio A1 de tenascina C (Brack, *et al.*, (2006) *Clin Cancer Res*, 12, 3200-3208). La inmunocitocina F8-IL2 está compuesta por el anticuerpo humano F8, específico para el extradominio A de fibronectina, e IL-2 (Frey, *et al.*, (2010) *J Urol*, 184, 2540-2548; Villa, *et al.*, (2008) *Int J Cancer*, 122, 2405-2413).

35 La justificación para el desarrollo de estos productos se deriva de la observación de que F16-IL2 y F8-IL2 han presentado localización selectiva en sitios tumorales en determinados modelos animales de cáncer. En particular, el anticuerpo F16 parece reaccionar más con secciones tejido de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama y cáncer de pulmón en comparación con el anticuerpo L19 (Frey, *et al.*, 2010, Marlind, *et al.*, (2008) *Clin Cancer Res*, 14, 6515-6524, Pedretti, *et al.*, (2009) *Lung Cancer*, 64, 28-33).

40 Se ha demostrado previamente en ratones que portan teratocarcinoma F9 que la combinación de IL12-L19 con un anticuerpo anti-CTLA-4 fue claramente más eficaz que en el tratamiento con único agente (Halin, *et al.*, (2003) *Cancer Res*, 63, 3202-3210). Sin embargo, la combinación de L19-IL2 y anti-CTLA-4 nunca se ha sometido a prueba.

## 50 Sumario de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Se ha demostrado que la terapia de combinación con un anticuerpo de direccionamiento vascular fusionado a IL-2 y un anticuerpo anti-CTLA-4 tiene un efecto sinérgico en el tratamiento de tumores. En la invención, un efecto sinérgico está asociado con el uso secuencial de los dos anticuerpos, en el que el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra antes del conjugado de IL-2.

Por tanto, en un primer aspecto, se proporciona un ligando de bloqueo específico para CTLA-4 y un complejo de ligando de direccionamiento vascular/IL-2, para su uso secuencial en la inhibición del crecimiento de células tumorales.

60 Se entiende que CTLA-4 es responsable de atenuar la respuesta inmunitaria mediada por células T; en la sinapsis inmunitaria, CD28 regula por incremento, mientras que CTLA-4 regula por disminución, la expansión de células T. Por consiguiente, el ligando específico para CTLA-4 puede bloquear CTLA-4, o de otro modo prevenir la activación de CTLA-4 y, por tanto, prevenir la regulación por disminución de la expansión de células T. Se conocen ligandos de bloqueo de CTLA-4 e incluyen anticuerpos específicos para CTLA-4 y aptámeros de ARN específicos para CTLA-4. Otros ligandos, tales como CD80 y CD86, se unen a CTLA-4 y son responsables de activar CTLA-4 y potenciar su

actividad en la regulación por disminución de la proliferación de células T.

El ligando de bloqueo específico para CTLA-4 es un anticuerpo específico para CTLA-4.

5 Los anticuerpos que bloquean CTLA-4 incluyen ipilimumab y tremelimumab, así como 9H10 (eBioScience, San Diego, CA) y otros anticuerpos anti-CTLA-4 que están disponibles en la técnica.

10 En una realización, el ligando de direccionamiento vascular es un anticuerpo seleccionado. El direccionamiento vascular se ha descrito en la técnica para el tratamiento de cáncer. Los enfoques adecuados para su uso en la presente invención incluyen el uso de anticuerpos, péptidos, aptámeros de ARN y factores de crecimiento tales como VEGF-A.

15 En una realización, el ligando de direccionamiento vascular es un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como se describe a continuación, tal como un scFv.

20 Los marcadores que se expresan en la vasculatura del tumor incluyen, por ejemplo, MHC de clase II, VCAM-I, fibronectina, el antígeno de membrana específico de próstata, el receptor VEGF, antígeno relacionado con CD44 (TES-23), y similares. IL-2 puede complejarse con un ligando de direccionamiento vascular según técnicas conocidas, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO01/62298.

25 El ligando de direccionamiento vascular es específico para el extradominio B alternativamente empalmado de fibronectina. En una realización, el complejo de ligando de direccionamiento vascular/IL-2 es L19-IL2 (Carnemolla, *et al.*, (2002) Blood, 99, 1659-1665, Menrad, A. y Menssen, H. D. (2005) Expert Opin Ther Targets, 9, 491-500, Schliemann, *et al.*, (2009) Blood, 113, 2275-2283, Wagner, *et al.*, (2008) Clin Cancer Res, 14, 4951-4960).

30 El orden de administración de los ligandos tiene un efecto sobre el potencial terapéutico de los ligandos descritos en la presente invención. Aunque se observa retraso del crecimiento tumoral cuando se administran los ligandos, en cualquier orden, sólo se observa una reducción en la masa tumoral cuando el ligando específico para CTLA-4 se administra antes del complejo de ligando de direccionamiento vascular/IL-2.

35 En una realización, por tanto, las células tumorales forman parte de un tumor sólido, y el tratamiento da como resultado una reducción del tamaño de tumor.

El momento de la administración puede elegirse según criterios determinados de manera empírica; en una realización, sin embargo, el ligando específico para CTLA-4 se administra un día antes del complejo de ligando de direccionamiento vascular/IL-2.

40 En una realización adicional, la administración de tanto el ligando específico para CTLA-4 como el complejo de ligando de direccionamiento vascular/IL-2 se repite.

Por ejemplo, las administraciones repetidas se producen con cuatro días de diferencia.

45 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento de una célula tumoral, que comprende poner en contacto dicha célula con un ligando específico para CTLA-4 y un complejo de ligando de direccionamiento vascular/IL-2 según el primer aspecto de la invención.

**Descripción de las figuras**

50 Figura 1: Plan de tratamiento. 5 grupos de ratones recibieron inyecciones en los días 6/7 y 10/11 tras el implante de tumor. En el primer grupo de combinación, se administró tratamiento anti-CTLA-4 t 1 día antes de L19-IL2 (combo anti-CTLA-4), mientras que en el segundo grupo de combinación, se administró primero L19-IL2 (combo L19-IL2).

55 Figura 2: Resultados de la terapia. A) No pudo observarse ningún efecto terapéutico con el anticuerpo anti-CTLA-4 solo (no mostrado). L19-IL2 y los dos grupos de combinación mostraron un retardo del crecimiento tumoral de larga duración. B) En el día 22 tras el implante de tumor, el tamaño de tumor promedio en el grupo de combo CTLA-4 se redujo claramente (50%) en comparación con la monoterapia con L19-IL2 y el grupo de combo L19-IL2.

**Descripción detallada de la invención**

60 A menos que se declare específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que lo entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Puede usarse cualquier método y material con función similar o equivalente a las descritas en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención. Ahora se describen métodos, dispositivos y materiales adecuados para tales usos. Todas las publicaciones citadas en el presente documento se incorporan en el presente documento en su totalidad como referencia con el fin de describir y dar a conocer las metodologías, reactivos y herramientas notificadas en las publicaciones que podrían usarse junto con la invención.

65

Los métodos y técnicas de la presente solicitud se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos para los expertos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se tratan en toda la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario.

5 Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Gennaro, A. R., ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co.; Hardman, J. G., Limbird, L. E., y Gilman, A. G., eds. (2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. *et al.*, eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir, D. M., y Blackwell, C. C., eds. (1986) Handbook of Experimental Immunology, vol. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T. *et al.*, eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, vol. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.*, eds. (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4ª edición, John Wiley & Sons; Ream *et al.*, eds. (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; Newton, C. R., y Graham, A., eds. (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed., Springer-Verlag.

15 Un "ligando" según la invención es cualquier molécula que se une a una diana. En el contexto específico para la invención, se proporcionan ligandos que se unen a CTLA-4 y a una diana vascular, tal como fibronectina. Los ligandos pueden ser anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos, proteínas (tales como factores de crecimiento) y similares, que tienen la propiedad deseada de unirse a una diana específica, tal como un antígeno o un receptor. Los ligandos pueden comprender ligandos de anticuerpo y no de anticuerpo en cualquier combinación. Por ejemplo, el ligando de CTLA-4 puede ser un anticuerpo anti-CTLA-4, y el ligando de direccionamiento vascular puede ser el anticuerpo L19. El anticuerpo L19 se describe, por ejemplo, en el documento WO01/62298 o Pini *et al.*, (1998) J. Biol. Chem. 273:21769-21776.

25 Un ligando de "bloqueo" es uno que atenúa, en oposición a que potencia, la actividad de CTLA-4. Por ejemplo, un ligando tal como CD80 potencia la actividad de CTLA-4, pero un anticuerpo anti-CTLA-4 bloquea CTLA-4.

30 En una realización, un ligando se une a una diana específicamente. La unión específica es la capacidad de unirse a la diana relacionada con un mayor grado de afinidad y/o avedez que a otras dianas. Como tal, los ligandos pueden ser miembros de un par de unión específica, compuesto por el ligando y su diana relacionada. Los ligandos también pueden denominarse miembros de unión específica, por ejemplo, como en el documento WO01/62298.

35 Un "complejo de ligando/IL-2" es un complejo que comprende un ligando e IL-2. IL-2 puede conjugarse con el ligando mediante cualquier medio conocido, pero en una realización se conjuga usando un enlace peptídico y puede construirse como proteína de fusión con el ligando. En una realización, IL-2 puede sustituirse con otra citocina proinflamatoria, tal como IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-12, interferones, IL-15 y KGF-1.

40 El término "anticuerpo", a menos que se indique específicamente lo contrario, se usa para referirse a anticuerpos completos así como a fragmentos de unión a antígeno de tales anticuerpos. Por ejemplo, el término abarca moléculas de IgG de cuatro cadenas, así como fragmentos de anticuerpo.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmentos de anticuerpo" se refiere a porciones de un anticuerpo de longitud completa intacto, tal como una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv); fragmentos de anticuerpo multiespecífico tales como anticuerpos biespecíficos, trispecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión; anticuerpos camelizados; minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), anticuerpos que contienen V<sub>HH</sub>; y cualquier otro polipéptido formado a partir de fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, tal como se describe adicionalmente a continuación.

50 Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, tales como IgG, IgA o IgM; y de cualquier subclase, tales como IgG1 o IgG4. Diferentes clases y subclases de inmunoglobulina tienen diferentes propiedades, que pueden ser ventajosas en diferentes aplicaciones.

55 La especificidad, en el contexto de la presente invención, requiere que el anticuerpo reivindicado pueda unirse de manera selectiva a su antígeno relacionado definido, que es o bien CTLA-4 o bien una diana vascular.

60 Un "aptámero" es una molécula de ácido nucleico o un polipéptido que puede unirse a un diana específica. Los aptámeros pueden derivarse mediante selección, por ejemplo, mediante el procedimiento SELEX.

65 Los "ácidos nucleicos" tal como se refieren en el presente documento incluyen normalmente moléculas de ADN que codifican para los anticuerpos de la invención. Se prefieren vectores de expresión, que son adecuados para expresar los genes del anticuerpo en una célula huésped. En la técnica se conocen vectores de expresión y células huésped para la expresión génica del anticuerpo; véase, por ejemplo, Morrow, K.J. (2008) Genetic Engineering & Biotechnology News. (15 de junio de 2008) 28(12), y Backliwal, G., *et al.* (2008) Nucleic Acids Res. 36(15): e96-e96.

“CTLA-4”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a CTLA-4 de mamífero. La secuencia de CTLA-4 humano puede encontrarse en GenBank, número de registro AAH74893.1, GI:49904741. Puede seleccionarse CTLA-4 de mamífero de un roedor, tal como un ratón, o CTLA-4 humano. Los anticuerpos anti-CTLA-4 se conocen en la técnica, y están disponibles comercialmente.

Los marcadores o dianas vasculares son, en una realización, dianas tales como antígenos o receptores que se regulan por incremento de manera selectiva en células endoteliales tumorales frente a normales. Véase, por ejemplo, Thorpe, P.E., (2004) Clin. Cancer Res. 10:415-427. En una realización, el marcador o diana vascular es fibronectina, por ejemplo, el extradominio B de fibronectina.

Las células tumorales seleccionadas como diana por ligandos según la invención pueden ser cualquier célula tumoral, pero en una realización son células que forman parte de un tumor sólido. El tumor puede ser cualquier tumor sólido, incluyendo sin limitación uno cualquiera o más de lo siguiente: melanoma, neuroblastoma, carcinoma colorrectal, carcinoma renal, carcinoma de pulmón, metástasis de pulmón, carcinoma de mama, astrocitoma de alto grado (grado III, grado IV), meningioma y angioma.

El uso secuencial es la administración de los ligandos según la invención por separado, en secuencia, en vez de juntos. En algunas realizaciones, los ligandos se administran según una pauta posológica definida. Un día, tal como se entiende en el contexto del momento de la administración, es de aproximadamente 24 horas. Por ejemplo, si dos agentes se administran con un día de diferencia, pueden administrarse en el mismo momento del día, con 24 horas de diferencia. Sin embargo, pueden permitirse variaciones en el momento exacto, y por ejemplo un día puede ser tan poco como 12 horas, o tanto como 36 horas.

Por ejemplo, los dos ligandos diferentes según la invención pueden administrarse con entre 12 y 24 horas de diferencia, tal como 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 horas de diferencia.

En una realización, los dos ligandos diferentes según la invención pueden administrarse con entre 24 y 48 horas de diferencia, tal como 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 ó 48 horas de diferencia.

Administración repetida es la administración de un ligando según la invención más de una vez. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4 puede administrarse a intervalos de, por ejemplo, 1 o más días, tales como 2, 3, 4, 5 ó 6 días. En una realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra repetidamente a un intervalo de 4 días. El complejo de ligando de direccionamiento vascular/IL-2 puede administrarse en el mismo intervalo o en uno diferente, separado del ligando anti-CTLA-4 según la pauta posológica tal como se determina para uso secuencial.

## 1. Anticuerpos

La invención abarca fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos expuestos en las reivindicaciones. Los fragmentos de anticuerpos según la invención pueden unirse a CTLA-4 o a un marcador vascular. Abarcan fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y F(v), o las regiones variables de cadena ligera o pesada individuales o porción de las mismas. Los fragmentos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen de la porción Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión a tejido inespecífica que un anticuerpo intacto. Estos fragmentos pueden producirse a partir de anticuerpos intactos usando métodos bien conocidos, por ejemplo, mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>).

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que se unen a CTLA-4 o a un marcador vascular. Un scFv comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V<sub>H</sub>) unida operativamente a una región variable de cadena ligera de anticuerpo (V<sub>L</sub>) en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, juntas o individualmente, forman un sitio de unión que se une a αβTCR. Un scFv puede comprender una región V<sub>H</sub> en el extremo amino-terminal y una región V<sub>L</sub> en el extremo carboxilo-terminal. Alternativamente, el scFv puede comprender una región V<sub>L</sub> en el extremo amino-terminal y una región V<sub>H</sub> en el extremo carboxilo-terminal.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, se codifican por genes diferentes, pueden juntarse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que estén hechos como una cadena de proteína individual en la que las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). Un scFv puede comprender opcionalmente además un ligador de polipéptido entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan fragmentos de anticuerpo de dominio (dAb) tal como se describe en Ward, E.S. *et al.* (1989) Nature 341:544-546 que consiste en un dominio V<sub>H</sub>. Los anticuerpos y fragmentos también abarcan anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Se notifica que estos anticuerpos forman regiones de unión a antígeno usando sólo la región variable de cadena pesada, en que estos anticuerpos funcionales son dímeros de cadenas pesadas únicamente (denominados “anticuerpos de cadena pesada” o “HCAb”). Por consiguiente, los

anticuerpos y fragmentos pueden anticuerpos de cadena pesada (HCAb) que se unen específicamente a CTLA-4 o un marcador vascular. Los anticuerpos y fragmentos también abarcan anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión específicas para CTLA-4 o un marcador vascular. Estos constructos son polipéptidos de cadena sencilla que comprenden dominios de unión a antígeno fusionados a dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpo (véase el documento WO 2005/017148).

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan diacuerpos. Estos son anticuerpos bivalentes en los que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se expresan en una única cadena de polipéptido, pero usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza que los dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y crea así dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, el documento WO 93/11161). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo según la invención no reacciona de manera cruzada con ninguna diana distinta de CTLA-4 o un marcador vascular.

El anticuerpo o fragmento del mismo puede modificarse con el fin de aumentar su semivida sérica, por ejemplo, añadiendo moléculas, tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros de polisacáridos para aumentar la semivida.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden parecerse a anticuerpos individuales (o fragmentos de anticuerpo) pero tienen dos sitios de unión a antígeno diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante diversos métodos, tal como técnicas químicas, técnicas de "polidoma" o técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales es CTLA-4 o un marcador vascular. La otra especificidad puede seleccionarse de cualquier especificidad útil, incluyendo por ejemplo especificidad para albúmina sérica humana para la extensión de la semivida *in vivo*.

En una realización, puede construirse un anticuerpo biespecífico en el que una primera especificidad se dirige a un marcador vascular, y una segunda especificidad a IL-2, proporcionando por tanto un complejo que comprende un ligando específico para un marcador vascular e IL-2.

El anticuerpo L-19 se describió anteriormente. En una realización, el anticuerpo específico para un marcador vascular es el anticuerpo L-19.

El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en el presente documento. Se han revisado los anticuerpos anti-CTLA-4 en la bibliografía, por ejemplo en Melero *et al.*, (2007) Nature Reviews Cancer, 7:95-106. También están disponibles anticuerpos anti-CTLA-4 humanos y de otros mamíferos de proveedores comerciales, tales como Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.), Millipore (Billerica, MA, EE.UU.), eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.) y similares.

## 2. Producción de anticuerpos

Pueden obtenerse anticuerpos útiles en la presente invención de fuentes comerciales. Sin embargo, también es posible producir anticuerpos usando métodos que se conocen bien en la técnica. Las técnicas de producción de anticuerpos incluyen producción en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock *et al.* (1999) J. Immunol. Methods 231:147-157), gallinas (véase Morrow, K.J.J. (2000) Genet. Eng. News 20:1-55), ratones (véase Pollock *et al.*, anteriormente) o plantas (véase Doran, P.M. (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11:199-204, Ma. J.K-C. (1998) Nat. Med. 4:601-606, Baez, J. *et al.* (2000) BioPharm. 13:50-54, Stoger, E. *et al.* (2000) Plant Mol. Biol. 42:583-590). Los anticuerpos también pueden producirse mediante síntesis química o mediante expresión de genes que codifican para los anticuerpos en células huésped.

Se aísla un polinucleótido que codifica para el anticuerpo y se inserta en un constructo o vector replicable tal como un plásmido para propagación o expresión adicional en una célula huésped. Están disponibles en la técnica constructos o vectores (por ejemplo, vectores de expresión) adecuados para la expresión de una inmunoglobulina humanizada según la invención. Está disponible una variedad de vectores, incluyendo vectores que se mantienen en una única copia o múltiples copias en una célula huésped, o que se integran en el/los cromosoma(s) de la célula huésped. Los constructos o vectores pueden introducirse en una célula huésped adecuada, y pueden producirse células que expresan una inmunoglobulina humanizada y se mantienen en cultivo. Puede usarse un único vector o múltiples vectores para la expresión de una inmunoglobulina humanizada. Los polinucleótidos que codifican para el anticuerpo se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótido). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmido, virus, fago, transposones, minicromosomas cuyos plásmidos son una realización típica. Generalmente tales vectores incluyen además una secuencia de señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al polinucleótido de cadena ligera y/o pesada para facilitar la expresión. Los polinucleótidos que codifican para las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores

separados e introducirse (por ejemplo, mediante transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula huésped de manera simultánea o secuencial o, si se desea tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector antes de tal introducción. Puede proporcionarse un promotor para la expresión en una célula huésped adecuada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede unirse operativamente a un ácido nucleico que codifica para una inmunoglobulina humanizada o cadena de inmunoglobulina, de modo que dirige la expresión del polipéptido codificado. Está disponible una variedad de promotores adecuados para huéspedes procariontes y eucariotas. Los promotores procariontes incluyen promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*; 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas por ejemplo, enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores eucariotas incluyen promotores de levadura inducibles tales como alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, ácido fosfatasa, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo de nitrógeno o uso de maltosa/galactosa; promotores de ARN polimerasa II incluyendo promotores víricos tales como polioma, viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR) y el virus símico 40 temprano o tardío y promotores no víricos tales como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) Nucleic Acids Res. 18(17):5322). Los expertos en la técnica podrán seleccionar el promotor adecuado para expresar un anticuerpo humanizado o una porción del mismo de la invención.

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en células de eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en lugar de o así como los encontrados ubicados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamífero adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina e insulina. Alternativamente, puede usarse un elemento potenciador de un virus de célula eucariota tal como potenciador de SV40, potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, potenciador de polioma, potenciador baculovírico o locus de IgG2a murino (véase el documento WO 04/009823). Aunque tales potenciadores se ubican normalmente en el vector en un sitio aguas arriba del promotor, también pueden ubicarse en cualquier otro sitio por ejemplo, dentro de la región no traducida o aguas abajo de la señal de poliadenilación. La elección y el posicionamiento del potenciador pueden basarse en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión.

Además, los vectores (por ejemplo, vectores de expresión) comprenden normalmente un marcador seleccionable para la selección de células huésped que portan el vector, y, en el caso de un vector replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican para productos que confieren resistencia a los antibióticos o a los fármacos son marcadores seleccionables comunes y pueden usarse en células procariontes (por ejemplo, gen de f3-lactamasa (resistencia a ampicilina), gen de Tet (resistencia a tetraciclina) y células eucariotas (por ejemplo, neomicina (G418 o genética), gpt (ácido micofenólico), ampicilina, o genes de resistencia a higromicina). Los genes marcadores de dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican para el producto génico de marcadores auxotróficos del huésped (por ejemplo, LEU2, URA3, HIS3) se usan a menudo como marcadores seleccionables en levadura. También se contempla el uso de vectores víricos (por ejemplo, baculovirus) o de bacteriófagos, y vectores que pueden integrarse en el genoma de la célula huésped, tal como vectores retrovíricos.

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación y terminación están unidas operativamente al polinucleótido que codifica para el anticuerpo de esta invención. Tales señales se ubican normalmente en 3' del marco abierto de lectura. En sistemas de mamíferos, los ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de hormonas de crecimiento, factor de elongación-1 alfa y genes víricos (por ejemplo, SV40) o repeticiones terminales largas retrovíricas. En sistemas de levadura, los ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de los genes de fosfoglicerato quinasa (PGK) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En sistemas procariontes, no se requieren normalmente señales de poliadenilación y en su lugar es habitual emplear secuencias de terminación más cortas y más definidas. La elección de secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión. Además de lo anterior, otras características que pueden emplearse para mejorar rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación de codón específico de célula huésped. El uso de codones del anticuerpo de esta invención del mismo puede modificarse para acomodar el sesgo de codón de la célula huésped tal como para aumentar el transcrito y/o rendimiento del producto (por ejemplo, Hoekema, A. *et al.* (1987) Mol. Cell Biol. 7(8):2914-24). La elección de codones puede basarse en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión.

Por tanto, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para las inmunoglobulinas humanizadas, o cadenas pesadas o ligeras, de las mismas, de esta invención. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican para una porción de unión a antígeno de las inmunoglobulinas y sus cadenas.

Los anticuerpos según esta invención pueden producirse, por ejemplo, mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican para el anticuerpo en una célula huésped adecuada. La célula huésped puede producirse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los constructos de expresión (por ejemplo, uno o

- más vectores, por ejemplo, un vector de expresión de células de mamífero) descritos en el presente documento pueden introducirse en una célula huésped adecuada, y la célula resultante puede mantenerse (por ejemplo, en cultivo, en un animal, en una planta) en condiciones adecuadas para la expresión del/los constructo(s) o vector(es). Las células huésped pueden ser procaríotas, incluyendo células bacterianas tales como *E. coli* (por ejemplo, cepa DH5a™) (Invitrogen, Carlsbad, CA), PerC6 (Crucell, Leiden, NL) *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucariotas, tales como células de hongos o levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), u otras células eucariotas inferiores, y células de eucariotas superiores tales como las de insectos (por ejemplo, células Schnieder S2 de *Drosophila*, células de insecto Sf9) (documento WO 94/126087 (O'Connor)), células de insecto BTI-TN- 5B1-4 (High Five™) (Invitrogen), mamíferos (por ejemplo, células COS, tales como COS-1 (n.º de registro ATCC CRL-1650) y COS-7 (n.º de registro ATCC CRL-1651), CHO (por ejemplo, n.º de registro ATCC CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, L.A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77(7):4216-4220), 293 (n.º de registro ATCC CRL-1573), HeLa (n.º de registro ATCC CCL-2), CV1 (n.º de registro ATCC CCL-70), WOP (Dailey, L., *et al.* (1985) J. Virol., 54:739-749), 3T3, 293T (Pear, W.S., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:8392-8396), células NSO, células SP2/0, células HuT 78, y similares, o plantas (por ejemplo, tabaco, *Lemna* (lenteja de agua) y algas). Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al.*, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons Inc. (1993). En algunas realizaciones, la célula huésped no forma parte de un organismo multicelular (por ejemplo, planta o animal), por ejemplo, es una célula huésped aislada o forma parte un cultivo celular.
- Pueden cultivarse células huésped en matraces centrifugadores, matraces de agitación, frascos giratorios, reactores WAVE (por ejemplo, System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibras huecas pero para la producción a gran escala se prefiere que se usen reactores de tanque con agitación o reactores de bolsa (por ejemplo, Wave Biotech, Somerset, New Jersey EE.UU.) particularmente para cultivos en suspensión. Normalmente, los reactores de tanque con agitación se adaptan para la aireación usando por ejemplo, burbujeadores, deflectores o impulsores de baja cizalladura. Para columnas de burbujas y reactores de agitación por aire, puede usarse aireación directa con aire o burbujas de oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo libre de suero, el medio puede complementarse con un agente de protección de células tal como Pluronic F-68 para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden usarse microportadores como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de anclaje, o pueden adaptarse las células a un cultivo en suspensión. El cultivo de células huésped, particularmente células huésped de vertebrados, puede usar una variedad de modos de funcionamiento tales como procesamiento discontinuo, semi-continuo, discontinuo repetido (véase Drapeau *et al.* (1994) Cytotechnology 15:103-109), proceso discontinuo extendido o cultivo de perfusión. Aunque pueden cultivarse células huésped de mamífero transformadas de manera recombinante en medios que contienen suero, comprendiendo tales medios suero bovino fetal (FCS), se prefiere que tales células huésped se cultiven en medios libres de suero tales como los divulgados en Keen *et al.* (1995) Cytotechnology 17:153-163, o medios disponibles comercialmente tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EE.UU.), complementados cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo libre de suero de células huésped puede requerir que aquellas células se adaptan para crecer en condiciones libres de suero. Un enfoque de adaptación es cultivar tales células huésped en medios que contienen suero e intercambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por los medios libres de suero de modo que las células huésped aprenden a adaptarse en condiciones libres de suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg, K. *et al.* (1995) Animal Cell Technology: Developments Towards the 21st Century (Beuvery, E.C. *et al.*, eds), págs. 619-623, Kluwer Academic publishers). Los anticuerpos según la invención pueden secretarse en el medio y recuperarse y purificarse a partir del mismo usando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso previsto. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos requiere normalmente al menos el 95% de pureza según se determina mediante SDS-PAGE reductora, más normalmente el 98% o el 99% de pureza, cuando se compara con los medios de cultivo que comprenden los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, se retiran normalmente restos celulares de los medios de cultivo usando centrifugación seguido por una etapa de clarificación del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Alternativamente, el anticuerpo puede recogerse mediante microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación previa. Está disponible una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxapatita (HA), cromatografía de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de etiquetado de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (véase el documento US 5.429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, tras diversas etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía de afinidad de proteína A o G seguido por etapas de cromatografía adicionales tales como intercambio iónico y/o cromatografía de HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión molecular y precipitación de sulfato de amonio. Normalmente, también se emplean diversas etapas de retirada de virus (por ejemplo, nanofiltración usando por ejemplo, un filtro DV-20). Tras estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada que comprende al menos 10 mg/ml o más, por ejemplo, 100 mg/ml o más, del anticuerpo de la invención y, por tanto, forma una realización de la invención. Puede generarse una concentración de hasta 100 mg/ml o más mediante ultracentrifugación. Tales preparaciones están sustancialmente libres de formas agregadas de anticuerpos de la invención.
- Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpo. Tales fragmentos se localizan a nivel intracelular o dentro del periplasma. Pueden extraerse proteínas periplasmáticas

insolubles y replegarse formando proteínas activas según métodos conocidos por los expertos en la técnica, véase Sanchez *et al.* (1999) *J. Biotechnol.* 72:13-20; Cupit, P.M. *et al.* (1999) *Let. Appl. Microbiol.* 29:273-277.

La presente invención también se refiere a células que comprenden un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, de la invención (por ejemplo, un vector de expresión). Por ejemplo, un ácido nucleico (es decir, uno o más ácidos nucleicos) que codifica para las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina humanizada según la invención, o un constructo (es decir, uno o más constructos, por ejemplo, uno o más vectores) que comprende tal(es) ácido(s) nucleico(s), puede introducirse en una célula huésped adecuada mediante un método apropiado a la célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), estando o volviéndose el/los ácido(s) nucleico(s) unido(s) de manera operativa a uno o más elementos de control de expresión (por ejemplo, en un vector, en un constructo creado mediante procesos en la célula, integrados en el genoma de la célula huésped). Las células huésped pueden mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de inductor, medios adecuados complementados con sales, factores de crecimiento, antibiótico, complementos nutricionales adecuados, etc.), mediante lo cual se produce(n) el/los polipéptido(s) codificado(s). Si se desea, el anticuerpo humanizado codificado puede aislarse, por ejemplo, a partir de las células huésped, medio de cultivo o leche. Este procedimiento abarca la expresión en una célula huésped (por ejemplo, una célula de glándula mamaria) de un animal o planta (por ejemplo, tabaco) transgénicos (véase por ejemplo, el documento WO 92/03918).

### 3. Direccionamiento vascular

Se conoce en la técnica el uso de ligandos para dirigir agentes biológicos a los sitios de tumores mediante direccionamiento de marcadores vasculares. Por ejemplo, véase Thorpe *et al.*, (2003) *Cancer Res.* 63:1144-1147; Thorpe, E.R., *Clin. (2004) Cancer Res.* 10:415-427; Neri y Bicknell, (2005) *Nat Rev Cancer* 5:436-446; Ahlskog *et al.*, (2006) *Q J Nucl. Med. Imaging* 50:296-309; Gerber *et al.*, (2009) *MABs* 1:247-253.

Se ha descrito una variedad de dianas y ligandos en relación con la terapia antitumoral, incluyendo MHC de clase II (Huang *et al.*, (1997) *Science* 275:547-550); VCAM-1 (Ran *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:4646-4653); el dominio EB-D de fibronectina (Nilsson *et al.*, (2001) *Cancer Res.* 61:711-716); antígeno de membrana específico de próstata (Liu *et al.*, (2002) *Cancer Res.* 62:5470-5475); antígeno relacionado con CD44 (TES-23; Tsunoda *et al.*, (1999) *Br. J. Cancer*, 81:1155-1161); integrinas (Ruegg *et al.*, (2004) *BBA* 1654:51-67); y anexina A1 (Oh *et al.*, (2004) *Nature* 429:629-635). Se ha descrito el uso de VEGF para seleccionar como diana el receptor de VEGF y suministrar una toxina, por ejemplo en Arora *et al.*, (1999) *Cancer Res.*, 59:183-188, y Ramakrishnan *et al.*, (1996) *Cancer Res.*, 56:1324-1330. Se ha descrito el uso del anticuerpo L-19 para dirigir IL-12 a tumores por Halin *et al.*, (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:264-269, y Carnemolla *et al.*, (2002) *Blood* 99:1659-1665.

Se han descrito anticuerpos, factores de crecimiento y otros péptidos para su direccionamiento a tumores. Otros ligandos no peptídicos incluyen aptámeros de ácido nucleico, tal como se describe en Santulli-Marotto *et al.*, (2003) *Cancer Res.* 63:7483-7489. Pueden derivarse aptámeros mediante procedimientos de selección *in vitro*, tales como Selex.

Puede llevarse a cabo la conjugación de IL-2 con un ligando adecuado para el direccionamiento vascular tal como se indicó anteriormente, conjugando el ligando con la molécula de IL-2 por medio de un enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende la molécula de IL-2 y el ligando, o un componente de la cadena de polipéptido del mismo. Véase Taniguchi *et al.* (1983) *Nature* 302, 305-310; Maeda *et al.* (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115: 1040-1047; Devos *et al.* (1983) *Nucl. Acids Res.* 11: 4307-4323 para información de secuencia de IL-2 útil en la preparación de un polipéptido de fusión que comprende IL-2.

Otros medios para la conjugación incluyen conjugación química, especialmente reticulación usando un reactivo bifuncional (por ejemplo, empleando ADOUBLE-REAGENTS™; Guía de selección de reactivos de reticulación, Pierce).

### 4. Composiciones farmacéuticas

En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención, o un ligando o ligandos tal como se define en el presente documento según la invención. Los ligandos pueden ser inmunoglobulinas, péptidos, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas, tal como se trata en el presente documento. En la siguiente descripción se denominan "compuestos".

Una composición farmacéutica según la invención es una composición de materia que comprende un compuesto o compuestos que pueden modular la actividad de células T como principio activo. Normalmente, el compuesto está en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable, o por ejemplo, cuando sea apropiado, un análogo, forma de base libre, tautómero, racemato de enantiómero, o combinación de los mismos. Se contempla que los principios activos de una composición farmacéutica que comprende el principio activo según la invención presenten excelente actividad terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedad injerto contra huésped, cuando se administran en una cantidad que depende del caso particular.

- En otra realización, uno o más compuestos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier compuesto reconocido en la técnica conocido por ser adecuado para tratar la indicación particular en el tratamiento de cualquiera de los estados mencionados anteriormente, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, los ligandos según la invención pueden administrarse de manera conjunta con agentes quimioterapéuticos. Por consiguiente, uno o más compuestos de la invención pueden combinarse con uno o más compuestos reconocidos en la técnica conocidos por ser adecuados para tratar las indicaciones anteriores de manera que puede administrarse una única composición conveniente al sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.
- Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis fraccionadas al día o la dosis puede reducirse de manera proporcional tal como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. El principio activo puede administrarse de manera conveniente tal como por vía oral, intravenosa (cuando sea soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o vías de supositorio o implante (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta).
- Dependiendo de la vía de administración, puede requerirse que el principio activo se recubra con un material para proteger dichos componentes de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dicho componente.
- Para administrar el principio activo mediante una administración distinta de la parenteral, se recubrirá o se administrará, con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el principio activo puede administrarse en un adyuvante, administrarse de manera conjunta con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Se usa adyuvante en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto inmunoestimulante tal como interferón. Los adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como oleil éter de polioxietileno y éter de polietileno de n-hexadecil. Los inhibidores enzimáticos incluyen tripsina pancreática.
- Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales. El principio activo también puede administrarse por vía parental o intraperitoneal.
- También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones de almacenamiento y uso ordinarias, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.
- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de disoluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de producción y almacenamiento, y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes.
- La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tirmersal, y similares. En determinados casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando el principio activo en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con diversos de los demás componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización mediante filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el principio activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los demás componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y la técnica de secado por congelación que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de la disolución estéril previamente filtrada del mismo.
- Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente atóxico en las cantidades empleadas. Además, el principio activo puede incorporarse en formulaciones y preparaciones de liberación sostenida.
- Tal como se usa en el presente documento "portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en el caso en el que cualquier medio o agente

convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias adecuadas para sujetos mamíferos que van a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación novedosas de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formulación tal como material activo para el tratamiento de enfermedades en sujetos vivos que tienen un estado enfermo en el que la salud corporal se ve afectada.

Los principios activos principales se formulan en composición para administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado en forma unitaria de dosificación. En el caso de composiciones que contienen principios activos complementarios, las dosificaciones se determinan por referencia a la dosis usual y la manera de administración de dichos componentes.

Con el fin de facilitar el suministro de compuestos peptídicos, incluyendo anticuerpos, a células, pueden modificarse péptidos con el fin de mejorar su capacidad de atravesar una membrana celular. Por ejemplo, el documento US 5.149.782 da a conocer el uso de péptidos fusogénicos, péptidos de formación de canales de iones, péptidos de membrana, ácidos grasos de cadena larga y otros agentes de mezcladores de membrana para aumentar el transporte de proteínas a través de la membrana celular. Estos y otros métodos también se describen en los documentos WO 97/37016 y US 5.108.921, incorporados en el presente documento como referencia. En un aspecto adicional se proporciona el principio activo de la invención tal como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades o bien solo o bien en combinación con compuesto reconocidos en la técnica conocidos por ser adecuados para tratar la indicación particular. Por consiguiente, se proporciona el uso de un principio activo de la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con una respuesta inmunitaria aberrante.

Además, se proporciona un método para tratar un estado asociado con una respuesta inmunitaria aberrante, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando que puede identificarse usando un método de ensayo tal como se describió anteriormente. La invención se describe además, con fines de ilustración sólo, en el siguiente ejemplo.

### **Ejemplo**

#### **Métodos:**

Se obtuvieron ratones que portaban tumores mediante inyección subcutánea de células de teratocarcinoma F9 ( $2 \times 10^7$ ) en el flanco de ratones hembra 129/SvEv de 10 semanas de edad mediante inyección s.c. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 50 - 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se agruparon al azar (n = 5) y se inició el tratamiento. A los ratones se les inyectó en la vena lateral de la cola o bien 30 ug de L19-IL2, 50 ug de anticuerpo anti-CTLA4 o bien PBS durante dos inyecciones (días 6 y 10).

Se monitorizaron los ratones diariamente, se midieron los volúmenes de tumor de tres a cuatro veces por semana con un compás calibrador digital y se calcularon usando la fórmula: volumen = longitud x ancho<sup>2</sup> x 0,5. Se sacrificaron los animales cuando los volúmenes de tumor alcanzaron 2000 mm<sup>3</sup>. Se realizaron los experimentos con una licencia de proyecto concedida por el Veterinaeramt des Kantons Zuerich, Suiza (169/2008).

#### **Resultados:**

Para investigar si la administración combinada de L19-IL2 y un anticuerpo anti-CTLA-4 daría como resultado una actividad antitumoral potenciada, se realizó un experimento de terapia en ratones 129SV inmunocompetentes que portaban teratocarcinoma F9 injertado s.c. Los grupos de ratones (5 animales) recibieron inyecciones en los días 6/7 y 10/11 (véase la figura 1).

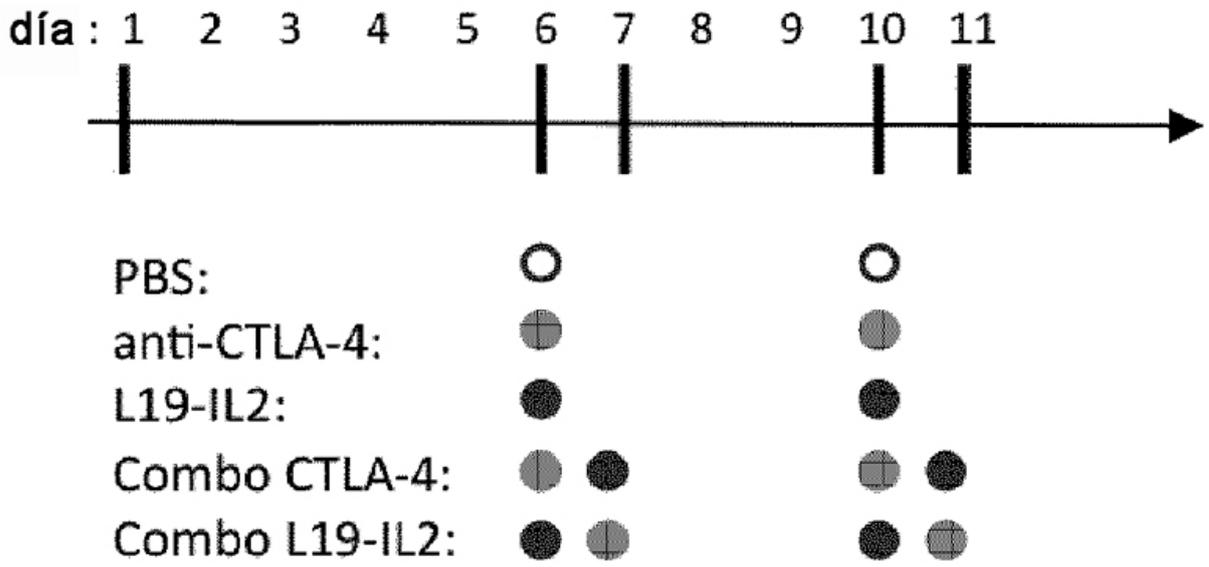
Se sometió a prueba la combinación de L19-IL2 y anti-CTLA-4 en dos esquemas diferentes con el fin de evaluar posibles efectos dependientes de secuencia. En el primer grupo de combinación, se administró tratamiento anti-CTLA-4 t 1 día antes de L19-IL2 (combo anti-CTLA-4), mientras que en el segundo grupo de combinación, se administró primero L19-IL2 (combo L19-IL2).

No pudo demostrarse ningún beneficio terapéutico para el anticuerpo anti-CTLA-4 en este modelo de tumor. L19-IL2 y los dos grupos de combinación mostraron un retardo del crecimiento tumoral de larga duración. Una semana después de la última inyección, los tumores empezaron a crecer de nuevo. Sin embargo, en el grupo de combinación en el que se administró anti-CTLA-4 un día antes de L19-IL2, se observó una reducción del 50% del

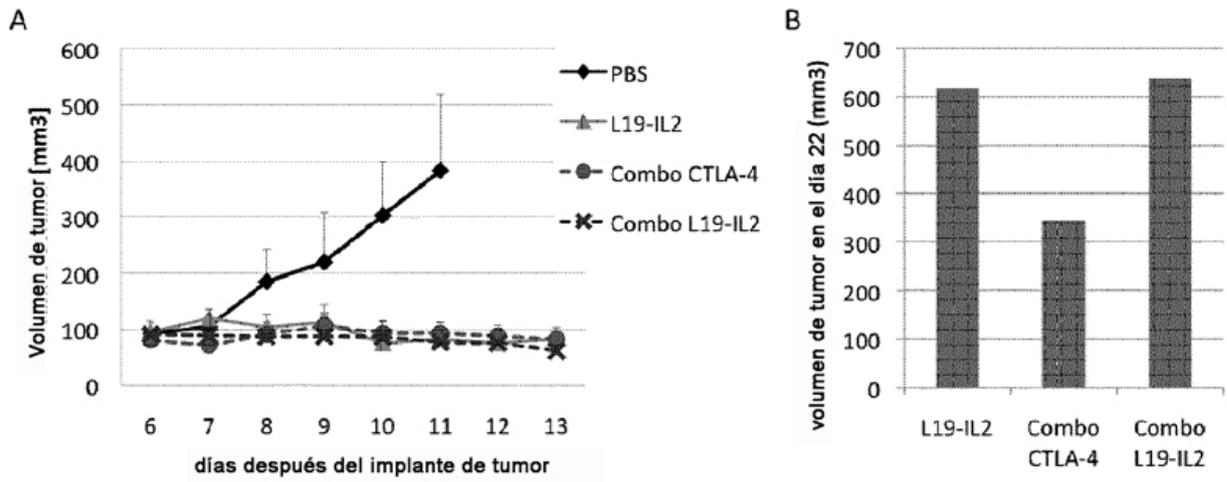
tamaño de tumor en comparación con los demás grupos.

**REIVINDICACIONES**

1. Ligando de bloqueo específico para CTLA-4 que es un anticuerpo anti-CTLA-4 y complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2, en el que el anticuerpo de direccionamiento vascular es específico para el extradominio B alternativamente empalmado de fibronectina, para su uso secuencial en la inhibición del crecimiento de células tumorales, en el que el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra antes del complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2.  
5
2. Ligando de bloqueo específico para CTLA-4 y complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2 según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-CTLA-4 es un scFv.  
10
3. Ligando de bloqueo específico para CTLA-4 y complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2 según cualquier reivindicación anterior para el uso según cualquier reivindicación anterior, en el que las células tumorales forman parte de un tumor sólido, y el tratamiento da como resultado una reducción del tamaño de tumor.  
15
4. Ligando de bloqueo específico para CTLA-4 y complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2 según la reivindicación 3 para el uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra un día antes del complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2.  
20
5. Ligando de bloqueo específico para CTLA-4 y complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2 según cualquier reivindicación anterior para el uso según cualquier reivindicación anterior, en el que la administración de tanto el anticuerpo anti-CTLA-4 como el complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2 se repite.  
25
6. Ligando de bloqueo específico para CTLA-4 y complejo de anticuerpo de direccionamiento vascular/IL-2 según la reivindicación 5 para el uso según la reivindicación 5, en el que las administraciones repetidas se producen con cuatro días de diferencia.  
30



**Figura 1**



**Figura 2**