

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 179**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/EP2012/062705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12735490 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2760886**

54 Título: **Terapia de combinación de inmunocitocinas**

30 Prioridad:

26.09.2011 US 201161539131 P

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

22.05.2020

73 Titular/es:

PHILOGEN S.P.A. (100.0%)

La Lizza 7

53100 Siena, IT

72 Inventor/es:

SCHWAGER, KATHRIN

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 762 179 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 de combinación de inmunocitocinas

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a una terapia de combinación para tumores en la que se administran un inmunoconjugado de TNF α y un inmunoconjugado de IL2 directamente al sitio de tumor.

10 Antecedentes

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina producida por muchos tipos de células, principalmente monocitos y macrófagos activados. Se expresa como una proteína precursora transmembrana integral de 26 kDa de la cual se libera una proteína madura de aproximadamente 17 kDa mediante escisión proteolítica. El TNF α bioactivo soluble es un homotrímero que se une a receptores de la superficie celular. Se ha demostrado que el TNF α induce necrosis de tumores sólidos. Ejerce su efecto principalmente sobre el endotelio de la vasculatura asociada a tumor, con permeabilidad aumentada, regulación por incremento del factor tisular, deposición de fibrina y trombosis, y destrucción masiva de las células endoteliales.

20 La interleucina-2 (IL2), una citocina en haces de cuatro hélices α producida por linfocitos T cooperadores de tipo 1, desempeña un papel esencial en las fases de activación de respuestas inmunitarias tanto adaptivas como innatas. Aunque no se cree que tenga un efecto citotóxico directo sobre células cancerosas, se ha comunicado que induce regresión tumoral estimulando una respuesta inmunitaria mediada por células.

25 Se han probado inyecciones intratumorales de IL2 en pacientes con melanoma metastásico [1]. En ese estudio, se administró el tratamiento tres veces a la semana durante al menos 2 semanas, y en general se comunicó que el 69% de los pacientes lograron una respuesta completa.

30 El documento WO01/66298 describió inmunoconjugados que comprenden TNF α e IL2 respectivamente, fusionados al anticuerpo L19. L19 se une específicamente al dominio ED-B de la isoforma de fibronectina B-FN, que es uno de los marcadores mejor conocidos de angiogénesis (documentos US 10/382.107; WO01/62298). ED-B es un extradominio de 91 aminoácidos encontrado en la isoforma B-FN y es idéntico en ratón, rata, conejo, perro y hombre. B-FN se acumula alrededor de estructuras neovasculares en tumores agresivos y otros tejidos que experimentan angiogénesis, tales como el endometrio en la fase proliferativa y algunas estructuras oculares en estados patológicos, pero es de otro modo indetectable en tejidos adultos normales.

35 Carnemolla *et al.* [2] describieron el potenciamiento de las propiedades antitumorales de IL2 mediante su administración dirigida a la matriz extracelular de los vasos sanguíneos del tumor en un inmunoconjugado de L19-IL2.

40 Christ *et al.* [3] describieron la administración intratumoral de un inmunoconjugado de IL2, un inmunoconjugado de TNF α , o anticuerpo solo. El anticuerpo usado era anti-EGFR, que tenía un efecto antitumoral. Se comunicó una respuesta inmunitaria antitumoral tras múltiples inyecciones de cualquier proteína de fusión.

45 Borsi *et al.* [4] comunicaron un estudio en el que se administraron inmunoconjugados de L19-TNF α y de L19-IL2 por vía intravenosa a ratones en los días 7 y 10 tras la implantación de células tumorales. Se usó L19 para concentrar y maximizar los efectos antitumorales de las citocinas administradas por vía sistémica. Se comunicó que la combinación de inmunocitocinas tenía un efecto sinérgico sobre el volumen de tumor. Los ratones que recibieron el tratamiento de combinación tuvieron un volumen de tumor notablemente reducido en comparación con los que recibieron sólo una inmunocitocina.

Sumario de la invención

55 Se comunican en este caso efectos inesperados sobre tumores que resultan de la administración local de una combinación de inmunocitocinas, TNF α -L19 e IL2-L19, en el sitio de tumor. Una única administración de estas dos inmunocitocinas fomentó la erradicación completa de grandes tumores subcutáneos en ratones.

60 Los ratones recibieron una única inyección intratumoral del TNF α -L19, una única inyección intratumoral de IL2-L19, o la combinación. No se administraron tratamientos adicionales. Se midió el volumen de tumor diariamente y se observó que los tumores en ratones tratados con la terapia de combinación redujeron rápidamente su tamaño y parecían estar completamente eliminados en un plazo de días y no mostraron recrecimiento. En comparación con ratones de control tratados con solución salina, los ratones tratados con una citocina sola también mostraron inhibición del crecimiento del tumor, pero los tumores en estos ratones, no obstante, continuaron aumentando de tamaño lentamente. Estos resultados muestran un efecto sinérgico de la terapia de citocinas combinada, y un efecto terapéutico notable, en el que los tumores se erradicaron tras únicamente una única dosis de cada citocina.

5 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención es una composición que comprende una combinación de un inmunocombinado de TNF α y un inmunocombinado de IL2 para su uso en un método de tratamiento de un tumor cutáneo en un paciente inyectando una única dosis de la composición, en la que el inmunocombinado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, y el inmunocombinado de IL2 comprende IL2 unida a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, en la que el método comprende inyección intratumoral de la composición.

10 Un segundo aspecto de la invención es una composición que comprende un inmunocombinado de TNF α para su uso en un método de tratamiento de un tumor cutáneo en un paciente inyectando una única dosis de dicha composición y una única dosis de un inmunocombinado de IL2, en la que el inmunocombinado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, y el inmunocombinado de IL2 comprende IL2 unida a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, en la que el método comprende inyección intratumoral simultánea del inmunocombinado de TNF α y el inmunocombinado de IL2.

20 Un tercer aspecto de la invención es una composición que comprende un inmunocombinado de IL2 para su uso en un método de tratamiento de un tumor cutáneo en un paciente inyectando una única dosis de dicha composición y una única dosis de un inmunocombinado de TNF α , en la que el inmunocombinado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, y el inmunocombinado de IL2 comprende IL2 unida a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, en la que el método comprende inyección intratumoral simultánea del inmunocombinado de TNF α y el inmunocombinado de IL2.

25 En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo en el inmunocombinado de TNF α y la molécula de anticuerpo en el inmunocombinado de IL2 son moléculas de anticuerpo idénticas.

30 En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad de L19 (CDR), en la que las CDR de L19 son:

CDR1 de VH	SFSMS	SEQ ID NO: 1
CDR2 de VH	SIGSSGTTYADSVKG	SEQ ID NO: 2
CDR3 de VH	PFPYFDY	SEQ ID NO: 3
CDR1 de VL	RASQSVSSSFLA	SEQ ID NO: 4
CDR2 de VL	YASSRAT	SEQ ID NO: 5
CDR3 de VL	QQTGRIPPT	SEQ ID NO: 6

35 La molécula de anticuerpo puede comprender el dominio VH de L19 SEQ ID NO: 7 y el dominio VL de L19 SEQ ID NO: 9. La molécula de anticuerpo puede ser un scFv, por ejemplo el scFv-L19 SEQ ID NO: 10.

En algunas realizaciones, uno o ambos inmunocombinados portan un marcador detectable. En algunas realizaciones, el método comprende inyectar simultáneamente el inmunocombinado de TNF α y el inmunocombinado de IL2 en o bien:

- 40 (a) inyecciones separadas inyectadas simultáneamente; o bien
(b) una inyección combinada.

45 En algunas realizaciones, el método comprende inyectar una única dosis de 10 - 100 μ g de un inmunocombinado de IL2-scFv en el sitio de tumor. En algunas realizaciones, el método comprende inyectar una única dosis de 2 - 20 μ g de un inmunocombinado TNF α -scFv en el sitio de tumor.

50 El método puede comprender tratar múltiples tumores cutáneos en el paciente inyectando una única dosis del inmunocombinado de TNF α y una única dosis del inmunocombinado de IL2 en el sitio de cada tumor. El tumor cutáneo puede ser un tumor primario. El tumor cutáneo puede ser un carcinoma o un melanoma.

En algunas realizaciones, el paciente es uno que no ha recibido tratamiento previo con IL-2 o TNF α . Preferiblemente, el tumor cutáneo se erradica.

55 Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de L19 son SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9 respectivamente (figura 3).

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla Fv (scFv) u otro fragmento de anticuerpo de bajo peso molecular y/o que carece de una región Fc. Estas propiedades ayudan con el direccionamiento y la penetración tisular del inmunocombinado en el sitio de tumor. Una molécula de anticuerpo preferida es scFv-L19, que es un scFv que comprende un dominio VH de L19 y un dominio VL de L19, en el que el VH y VL se unen conjuntamente en una única cadena polipeptídica mediante una secuencia de ligador peptídico. El dominio VH contiene secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH, y el dominio VL contiene secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de VL. El dominio VH puede tener una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la figura 3 (SEQ ID NO: 7). El dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la figura 3 (SEQ ID NO: 9). Los dominios VH y VL se unen normalmente mediante un ligador peptídico tal como el ligador de 12 residuos mostrado en la figura 3 (SEQ ID NO: 8). Preferiblemente, el scFv-L19 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 3 (SEQ ID NO: 10).

Puede usarse un ligador molecular tal como un péptido para unir la citocina a la molécula de anticuerpo, facilitando la expresión de toda o parte de la inmunocitocina como proteína de fusión. Cuando la molécula de anticuerpo es también una molécula de cadenas sencillas, tal como scFv, puede producirse toda la cadena polipeptídica de inmunocitocina de manera conveniente como proteína de fusión. Para el inmunocombinado de TNF α , las proteínas de fusión se ensamblan entonces en trímeros, permitiendo que el TNF α adopte su forma trimérica normal [4].

Opcionalmente, la inmunocitocina porta un marcador detectable y/o funcional, tal como un isótopo radiactivo. El L19 radiomarcado y su uso en la terapia contra el cáncer se ha descrito anteriormente.

Generalmente, es conveniente proporcionar el inmunocombinado de IL2 y el inmunocombinado de TNF α como moléculas separadas. Pueden proporcionarse como preparación combinada, o como formulaciones separadas para permitir la administración simultánea. El médico puede determinar la manera más adecuada de administrar la dosis individual de cada inmunocitocina al paciente. Por ejemplo, el método de tratamiento puede comprender inyectar el inmunocombinado de TNF α y el inmunocombinado de IL2 en inyecciones separadas, simultáneamente. Las dos inmunocitocinas pueden inyectarse en el mismo punto en el sitio de tumor, o en diferentes puntos. Puede administrarse una inyección combinada de ambas inmunocitocinas. Puede ser preferible administrar una dosis en múltiples inyecciones, por ejemplo para inyectar múltiples ubicaciones a lo largo del tumor o alrededor del sitio de tumor, o para facilitar la administración de un volumen mayor de inmunocitocina.

La dosis es una cantidad de citocina, administrada una vez, eficaz para tratar el tumor en la terapia de combinación según la invención. Puede administrarse una única dosis en un periodo de tratamiento de 1 hora o menos, preferiblemente en un periodo de 30 minutos o menos, por ejemplo 15, 10, 5 ó 1 minuto o menos.

La cantidad de TNF α o IL2 administrada dependerá del tamaño y la naturaleza del tumor, entre otros factores. Por ejemplo, la dosis de un inmunocombinado de TNF α -scFv puede estar en el intervalo de 2 - 20 μ g, por ejemplo 5 - 10 μ g. La dosis de inmunocombinado de IL2-scFv puede estar en el intervalo de 10 - 100 μ g, por ejemplo 20 - 40 μ g. Pueden calcularse directamente las dosis correspondientes usando otros formatos de inmunocombinados para administrar una cantidad de citocina apropiada. Éstos son sólo ejemplos y, por supuesto, pueden usarse diferentes dosis. El médico determinará una cantidad terapéuticamente eficaz para la administración.

Tal como se comunicó en este caso, una única dosis del inmunocombinado de TNF α y una única dosis del inmunocombinado de IL2 fueron suficientes para la terapia tumoral. No se requirieron múltiples dosis, y el tratamiento de un tumor según la presente invención no comprende repetir la terapia de combinación. Además de las ventajas que esto ofrece a los pacientes, el régimen de dosis individual proporciona una ventaja considerable a los médicos y ahorros en los costes significativos.

Por consiguiente, en el tratamiento de un tumor particular, no se repite el método de la invención. El método de tratamiento del tumor puede comprender:

(a) inyectar una única dosis del inmunocombinado de TNF α y una única dosis del inmunocombinado de IL2 en el sitio de tumor, y

no repetir la etapa (a).

El tumor se trata sin ninguna administración repetida de la combinación de inmunocitocinas al sitio de tumor. Tal como se muestra en el presente documento, puede tratarse un tumor sin ninguna inyección posterior de un inmunocombinado de TNF α o un inmunocombinado de IL2. De hecho, el tumor puede tratarse sin administrar ningún agente antineoplásico adicional al paciente. Opcionalmente, al paciente no se le ha administrado previamente ni TNF α ni IL2 para el tumor, aunque en algunos casos un paciente puede haber recibido terapia previa con sólo uno de IL2, TNF α o un inmunocombinado que incluye una de estas citocinas, que no lograron el tratamiento completo del tumor.

Por consiguiente, un método de la invención puede comprender tratar un tumor en un paciente inyectando una dosis del inmunocombinado de TNF α y una dosis del inmunocombinado de IL2 en el sitio de tumor, en el que el tumor se trata sin administrar ninguna dosis posterior del inmunocombinado de TNF α o el inmunocombinado de IL2 al sitio de tumor.

5 Por supuesto, el método de la invención puede usarse para tratar múltiples tumores en un paciente, realizando el método en cada tumor.

10 Otros tratamientos que pueden usarse en combinación con la invención incluyen la administración de dosis adecuadas de fármacos de alivio del dolor tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina o antieméticos.

Las inmunocitocinas se inyectan en el sitio del tumor, mediante inyección intratumoral.

15 El tumor tratado puede ser un tumor primario o un tumor metastásico. La invención se refiere al tratamiento de tumores cutáneos, por ejemplo tumor cutáneo maligno, melanoma o carcinoma, dado que su ubicación es susceptible de una inyección local directa. Los métodos de la invención también pueden usarse en un contexto quirúrgico, cuando se realiza inyección antes, durante o después de la cirugía del tumor.

20 El tratamiento de un tumor según la presente invención puede incluir la erradicación completa del tumor. La desaparición de cualquier prueba de tumor vital después de detener las inyecciones representa el tratamiento completo del tumor. La desaparición del tumor puede determinarse cuando el tumor no tiene volumen discernible o ya no es visible. El tratamiento puede comprender tratamiento para erradicar el tumor y evitar el recrecimiento del tumor.

25 Las composiciones de la presente invención usadas en métodos de tratamiento de un tumor según la presente descripción pueden comprender inyectar una única dosis del inmunocombinado de TNF α y una única dosis del inmunocombinado de IL2 en el sitio de tumor, y observar la desaparición del tumor. También puede observarse la ausencia de recrecimiento del tumor.

30 Preferiblemente, se monitorizan los pacientes durante un periodo de seguimiento de al menos un mes, preferiblemente al menos seis meses o al menos un año, después de la administración de la terapia de combinación de inmunocitocinas. Puede observarse la desaparición del tumor, y la falta de recrecimiento del tumor, en el periodo de seguimiento.

35 En el caso de recidiva del tumor después del periodo de seguimiento, o si se desarrollan otros tumores, los pacientes pueden recibir un tratamiento adicional con terapia de combinación de inmunocitocinas según la invención, para eliminar el tumor adicional.

40 Por ejemplo, un método según la invención puede comprender erradicar un tumor en un paciente inyectando una única dosis del inmunocombinado de TNF α y una única dosis del inmunocombinado de IL2 en el sitio de tumor, en el que el tumor desaparece en ausencia de dosis adicionales del inmunocombinado de TNF α y/o el inmunocombinado de IL2.

45 Los aspectos de la invención se refieren a inmunocombinados de TNF α e IL2 para su uso en cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento. Una composición que comprende el inmunocombinado de TNF α y/o el inmunocombinado de IL2 se proporciona para su uso en un método tal como se describe. Las composiciones pueden comprender componentes adicionales, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables. Una composición puede comprender las inmunocitocinas como formulaciones separadas (por ejemplo acondicionadas por separado, opcionalmente en un kit), o como formulación combinada. La formulación puede adaptarse para administración intratumoral. También se da a conocer el uso del inmunocombinado de TNF α y/o el inmunocombinado de IL2 para la fabricación de un medicamento para su uso en un método tal como se describe en el presente documento.

50 También se dan a conocer moléculas de ácido nucleico que codifican para inmunocombinados. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células huésped. Un método de producción del inmunocombinado puede comprender expresar el ácido nucleico en células huésped cultivadas, opcionalmente seguido por la purificación del inmunocombinado del cultivo de células huésped. Los inmunocombinados de IL2 y TNF α se producen preferiblemente en cultivos celulares separados. Entonces pueden formularse individualmente como medicamentos para administración tal como se describe.

Descripción detallada

65 Determinados aspectos de la invención son tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas, que pueden combinarse con cualquier otra parte de la presente divulgación.

Una molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina ya sea natural o producida de manera sintética parcial o completamente. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión de antígeno-anticuerpo. Por tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión de antígeno-anticuerpo, ya sea natural o sintético completa o parcialmente. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión de antígeno-anticuerpo, o equivalente, fusionadas con otros polipéptidos. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se conoce bien (documentos EP0120694, EP0125023).

Técnicas adicionales disponibles en la técnica de modificación por ingeniería genética de anticuerpos hicieron posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden elaborarse hibridomas humanos tal como se describió previamente [5]. La presentación de fagos es otra técnica establecida [5, documento WO92/01047]. Pueden usarse ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpo de ratón se inactivan y se reemplazan funcionalmente con genes de anticuerpo humanos mientras que se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón para aislar anticuerpos humanos [6].

Pueden crearse moléculas de anticuerpo sintéticas mediante la expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados [7, 8].

Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Se prefieren fragmentos de anticuerpo en conjugados de la invención debido a su pequeño tamaño e interacción minimizada con otras moléculas y receptores (por ejemplo, receptor Fc). Se prefieren particularmente moléculas de Fv de cadenas sencillas (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL se unen mediante un ligador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno [9, 10]. Puede establecerse scFv mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL [11].

Otro pequeño fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un dAb (anticuerpo de dominio), concretamente la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo [12]. Los dAb de VH se producen de manera natural en camélidos (por ejemplo camello, llama) y pueden producirse inmunizando un camélido con un antígeno diana, aislando células B específicas de antígeno y clonando directamente genes de dAb a partir de células B individuales. Los dAb también pueden producirse en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad de temperatura los hace de manera particular fisiológicamente útiles y adecuados para la selección y maduración de afinidad.

Un sitio de unión de antígeno es la parte de una molécula que se une específicamente a y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina sitio de unión de antígeno-anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une específicamente a y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte particular del antígeno, parte que se denomina epítipo. Un sitio de unión de antígeno-anticuerpo puede proporcionarse por uno o más dominios variables de anticuerpo. Preferiblemente, un sitio de unión de antígeno-anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

El término "específico" puede usarse para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica(s). El término también puede aplicarse cuando, por ejemplo, un sitio de unión de antígeno es específico para un epítipo particular que es portado por varios antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que porta el sitio de unión de antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que portan el epítipo.

En los inmunoconjugados de la invención, la molécula de anticuerpo se une a un componente de matriz extracelular que es un marcador de crecimiento del tumor. La matriz extracelular (ECM) se remodela durante el crecimiento del tumor, y pueden expresarse selectivamente variantes de corte y empalme alternativas de componentes de ECM en el sitio de la lesión.

Un ejemplo es fibronectina. Por ejemplo, la isoforma B-FN de fibronectina contiene un extradominio ED-B. La molécula de anticuerpo se une específicamente a ED-B de isoforma de fibronectina B-FN. La molécula de anticuerpo puede comprender las CDR de L19. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede ser un scFv que tiene un dominio VH con una secuencia de aminoácidos que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y/o CDR3 de VH de L19, y un dominio VL con una secuencia de aminoácidos que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y/o CDR3 de VL de L19. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 100% con la secuencia de aminoácidos del dominio VH de L19 tal como se establece en SEQ ID NO: 7, y/o comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% o el 100% con la secuencia de aminoácidos del dominio VL de L19 tal como se establece en SEQ ID NO: 9. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo es un scFv(L19) que comprende un dominio VH de L19 (SEQ ID NO: 7) y un dominio VL de L19 (SEQ ID NO: 9). En una realización preferida, la molécula de anticuerpo es scFv(L19) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 (figura 3).

Pueden emplearse formas modificadas del dominio VH y/o VL de L19 en inmunoconjugados de la invención, por ejemplo una molécula de anticuerpo puede comprender el dominio VH de L19 o el dominio VL de L19 en el que se han realizado 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácido en una CDR y/o región de entramado, mientras se conserva la unión específica a fibronectina ED-B. Tales sustituciones de aminoácido son preferiblemente conservativas, por ejemplo, sustitución de un residuo hidrófobo por otro, un residuo polar por otro, arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina.

Otro ejemplo es tenascina-C (TnC), que existe en diversas isoformas generadas mediante corte y empalme alternativo. En tejidos neoplásicos, los dominios adicionales que contienen TnC se expresan más ampliamente que en tejidos normales, especialmente isoformas que contienen el dominio C (cTN-C) (documento WO00/63699). Por tanto, una molécula de anticuerpo puede unirse a una isoforma de corte y empalme de tenascina-C, por ejemplo, puede unirse al dominio C.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para los inmunoconjugados y partes de los mismos también forman parte de la invención. La molécula de ácido nucleico puede ser un vector, por ejemplo un plásmido adecuado para la expresión de la secuencia de nucleótidos. Normalmente la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un elemento regulador tal como un promotor para la transcripción.

Las moléculas de ácido nucleico pueden estar contenidas en una célula huésped, que puede ser una célula cotransfectada con las moléculas de ácido nucleico o una hija de una célula de este tipo. Las células, especialmente células eucariotas por ejemplo células HEK y CHO, o células bacterianas por ejemplo *Escherichia coli*, que contienen las moléculas de ácido nucleico también forman parte de la invención.

Pueden producirse inmunoconjugados de la invención usando técnicas recombinantes, por ejemplo, expresando todo o parte del inmunoconjugado como proteína de fusión. Normalmente la expresión se realiza en una célula huésped que contiene ácido nucleico, tal como se describió anteriormente. La expresión puede comprender, por tanto, cultivar una célula huésped de este tipo. Para las proteínas de fusión de TNF α , puede producirse trimerización de las subunidades en la célula o durante la purificación de las proteínas de fusión de la célula.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo está conjugada con la citocina por medio de un enlace peptídico, por ejemplo dentro de una proteína de fusión que comprende el TNF α o IL2 y la molécula de anticuerpo o una cadena polipeptídica de la misma. Véase el documento WO01/66298 y Borsi *et al.* [4] para información adicional sobre la preparación de inmunoconjugados que comprenden TNF α o IL2. Véase Carnemolla *et al.* [2], Taniguchi *et al.* [13], Maeda *et al.* [14] o Devos *et al.* [15] para información adicional de la secuencia de IL2 útil en la preparación de un polipéptido de fusión que comprende IL2.

TNF α usado en inmunoconjugados de la invención es preferiblemente TNF α humano. IL2 es preferiblemente IL-2 humano. Las moléculas de anticuerpo son preferiblemente moléculas de anticuerpos humanos o humanizados.

También se describe un método que comprende formular el inmunoconjugado en una composición farmacéutica. Generalmente, esto implica purificar el inmunoconjugado y combinarlo con un portador fisiológicamente aceptable.

Las composiciones según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden comprender, además del principio activo (inmunoconjugado), un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. Para la inyección en el sitio de tumor, el inmunoconjugado puede estar en forma de una disolución acuosa aceptable parenteralmente que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuadas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra el volumen de tumor a lo largo del tiempo en el experimento descrito en el ejemplo 1.

La figura 1B muestra datos de seguimiento complementarios a la figura 1A.

La figura 2 muestra el peso promedio de los ratones a lo largo del tiempo en el experimento descrito en el ejemplo 1.

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de scFv(L19) (SEQ ID NO: 10). Los dominios VH y VL se muestran por separado (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9, respectivamente). Las secuencias de CDR1, 2 y 3 en el dominio tanto VH como VL se muestran subrayadas. Los dominios VH y VL se separan mediante una secuencia de ligador peptídico de 12 residuos (SEQ ID NO: 8).

Experimentos

Ejemplo 1 - Combinación intratumoral de L19-IL2 y L19-muTNF

Procedimiento

- 5 Cepa de ratón: ratones hembra 129SVE, inmunocompetentes de 10 semanas de edad
- Se implantaron 20 millones de células F9
- Se inició el tratamiento el día 7 después de la implantación del tumor
- 10 El día 7, los ratones recibieron una única inyección intratumoral de 30 µg de L19-IL2, 7 µg de L19-muTNF, la combinación o PBS. El volumen total inyectado fue de 90 µl.
- No se administraron inyecciones adicionales.
- 15 Se midió el volumen de tumor diariamente.

Resultados

- 20 Volumen de tumor medido desde el día 7 hasta el día 12 (figura 1A) - resultados promedio.
- Los tumores de ratones que recibieron sólo solución salina aumentaron de tamaño desde aproximadamente el día 8 en adelante.
- 25 Los tumores de ratones que recibieron una única inmunocitocina comenzaron a aumentar de tamaño lentamente desde aproximadamente el día 10.
- Los tumores de ratones que recibieron la combinación de inmunocitocinas disminuyeron de tamaño a partir del día 9. Hacia el día 11 y 12, el volumen de tumor apenas podía medirse. No se observó crecimiento del tumor en mediciones de seguimiento tomadas hasta el día 20, cuando el volumen de tumor se midió a cero. También se registró el peso de los ratones a lo largo del tiempo (figura 2).
- 30 Observaciones visuales el día 10 después de la implantación del tumor:
- Se habían formado grandes tumores subcutáneos en los ratones tratados con PBS (control) (n = 4 ratones). Estaban presentes tumores visibles en los ratones tratados con L19-IL2 y L19-TNF, pero notablemente más pequeños que los tumores en ratones de control, y los tumores eran apenas visibles o no eran visibles en los ratones tratados con la combinación (n = 5 ratones en cada grupo).
- 35 Los resultados indican que la administración individual de la combinación de inmunocitocinas fue exitosa para lograr la erradicación completa del tumor tratado. Se observó que los tumores no volvieron a crecer en los ratones.
- 40

Detalles adicionales

- 45 Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 70 mm³, los ratones se agruparon al azar y se inició el tratamiento. Los ratones recibieron una única inyección intratumoral de L19-IL2 (30 µg), L19-TNF (7 µg) o la combinación en un volumen de 90 µl de PBS. Los ratones se monitorizaron diariamente, y se midió el volumen de tumor con un compás calibrador, usando la fórmula volumen = longitud x ancho² x 0,5.
- 50 La figura 1B muestra la continuación de los datos mostrados en la figura 1A. Los ratones tratados con la combinación permanecieron sin ningún tumor medible en mediciones de seguimiento adicionales hasta el día 27. Cinco de cinco ratones en este grupo lograron respuesta clínica.

Bibliografía

- 55 1 Weide *et al.* Cancer 1 de septiembre de 2010:4139-4146
- 2 Carnemolla *et al.* Blood 99:1659-1665 2002
- 60 3 Christ *et al.* Clin Cancer Res 7(5):1385-97 2001
- 4 Borsi *et al.* Blood 102:4384-4392 2003
- 5 Kontermann, R y Dubel, S, Antibody Engineering, Springer-Verlag Nueva York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 65 6 Mendez, M. *et al.* Nature Genet, 15(2): 146-156 1997

7 Knappik *et al.* J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86
 8 Krebs *et al.* Journal of Immunological Methods 254 2001 67-84

5 9 Bird *et al.*, Science, 242, 423-426, 1988
 10 Huston *et al.*, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988
 11 Reiter, Y. *et al.*, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996
 10 12 Holt *et al.* Trends in Biotechnology 21, 484-490 2003
 13 Taniguchi *et al.* Nature 302:305-310 1983
 15 14 Maeda *et al.* Biochem Biophys Res Comm 115:1040-1047 1983
 15 Devos *et al.* Nucl Acids Res 11:4307-4323 1983

Lista de secuencias

20 <110> Philogen S.P.A.
 Schwager, Kathrin
 <120> Terapia de combinación de inmunocitocinas

25 <130> HMK/FP6829428
 <150> Documento US 61/539.131
 <151> 26-09-2011

30 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 1
Ser Phe Ser Met Ser
 1 5

45 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 2
Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 7
 55 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 762 179 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética: ligador peptídico
 <400> 8

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

15 <210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 762 179 T3

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser
 115 120 125

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 130 135 140

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 165 170 175

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 180 185 190

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 195 200 205

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
 210 215 220

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 225 230 235

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una combinación de un inmunoconjugado de TNF α y un inmunoconjugado de IL2 para su uso en un método de tratamiento de un tumor cutáneo en un paciente inyectando una única dosis de la composición, en la que
- 5 el inmunoconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, y
- 10 el inmunoconjugado de IL2 comprende IL2 unida a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN,
- en la que el método comprende inyección intratumoral de la composición.
- 15 2. Composición que comprende un inmunoconjugado de TNF α para su uso en un método de tratamiento de un tumor cutáneo en un paciente inyectando una única dosis de dicha composición y una única dosis de un inmunoconjugado de IL2, en la que
- 20 el inmunoconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, y
- el inmunoconjugado de IL2 comprende IL2 unida a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN,
- 25 en la que el método comprende inyección intratumoral simultánea del inmunoconjugado de TNF α y el inmunoconjugado de IL2.
3. Composición que comprende un inmunoconjugado de IL2 para su uso en un método de tratamiento de un tumor cutáneo en un paciente inyectando una única dosis de dicha composición y una única dosis de un inmunoconjugado de TNF α , en la que
- 30 el inmunoconjugado de TNF α comprende TNF α unido a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN, y
- 35 el inmunoconjugado de IL2 comprende IL2 unida a una molécula de anticuerpo que se une al extradominio ED-B de la isoforma de corte y empalme de fibronectina B-FN,
- en la que el método comprende inyección intratumoral simultánea del inmunoconjugado de TNF α y el inmunoconjugado de IL2.
- 40 4. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la molécula de anticuerpo en el inmunoconjugado de TNF α y la molécula de anticuerpo en el inmunoconjugado de IL2 son moléculas de anticuerpo idénticas.
- 45 5. Composición para su uso según la reivindicación 4, en la que la molécula de anticuerpo comprende las regiones determinantes de complementariedad de L19 (CDR),
- en la que las CDR de L19 son:
- | | | |
|------------|------------------|--------------|
| CDR1 de VH | SFSMS | SEQ ID NO: 1 |
| CDR2 de VH | SISGSSGTTYADSVKG | SEQ ID NO: 2 |
| CDR3 de VH | PFPYFDY | SEQ ID NO: 3 |
| CDR1 de VL | RASQSVSSFLA | SEQ ID NO: 4 |
| CDR2 de VL | YASSRAT | SEQ ID NO: 5 |
| CDR3 de VL | QQTGRIPPT | SEQ ID NO: 6 |
- 50 6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH de L19 SEQ ID NO: 7 y el dominio VL de L19 SEQ ID NO: 9.
7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de anticuerpo es scFv,
- 55 opcionalmente en la que la molécula de anticuerpo es scFv-L19 SEQ ID NO: 10.

8. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que uno o ambos inmunoconjugados porta un marcador detectable.
- 5 9. Composición para su uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que el método comprende inyectar simultáneamente el inmunoconjugado de TNF α y el inmunoconjugado de IL2 en o bien:
- 10 (a) inyecciones separadas inyectadas simultáneamente; o bien
- (b) una inyección combinada.
10. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende inyectar una única dosis de 10 - 100 μ g de un inmunoconjugado de IL2-scFv en el sitio de tumor, y/o en la que el método comprende inyectar una única dosis de 2 - 20 μ g de un inmunoconjugado de TNF α -scFV en el sitio de tumor.
- 15 11. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el método comprende tratar múltiples tumores cutáneos en el paciente inyectando una única dosis del inmunoconjugado de TNF α y una única dosis del inmunoconjugado de IL2 en el sitio de cada tumor.
- 20 12. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tumor cutáneo es un tumor primario, opcionalmente en la que el tumor cutáneo es un carcinoma, además opcionalmente en la que el tumor cutáneo es un melanoma.
- 25 13. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el paciente es uno que no ha recibido tratamiento previo con IL-2 o TNF α , y/o
- en la que tratar el tumor comprende erradicar el tumor.

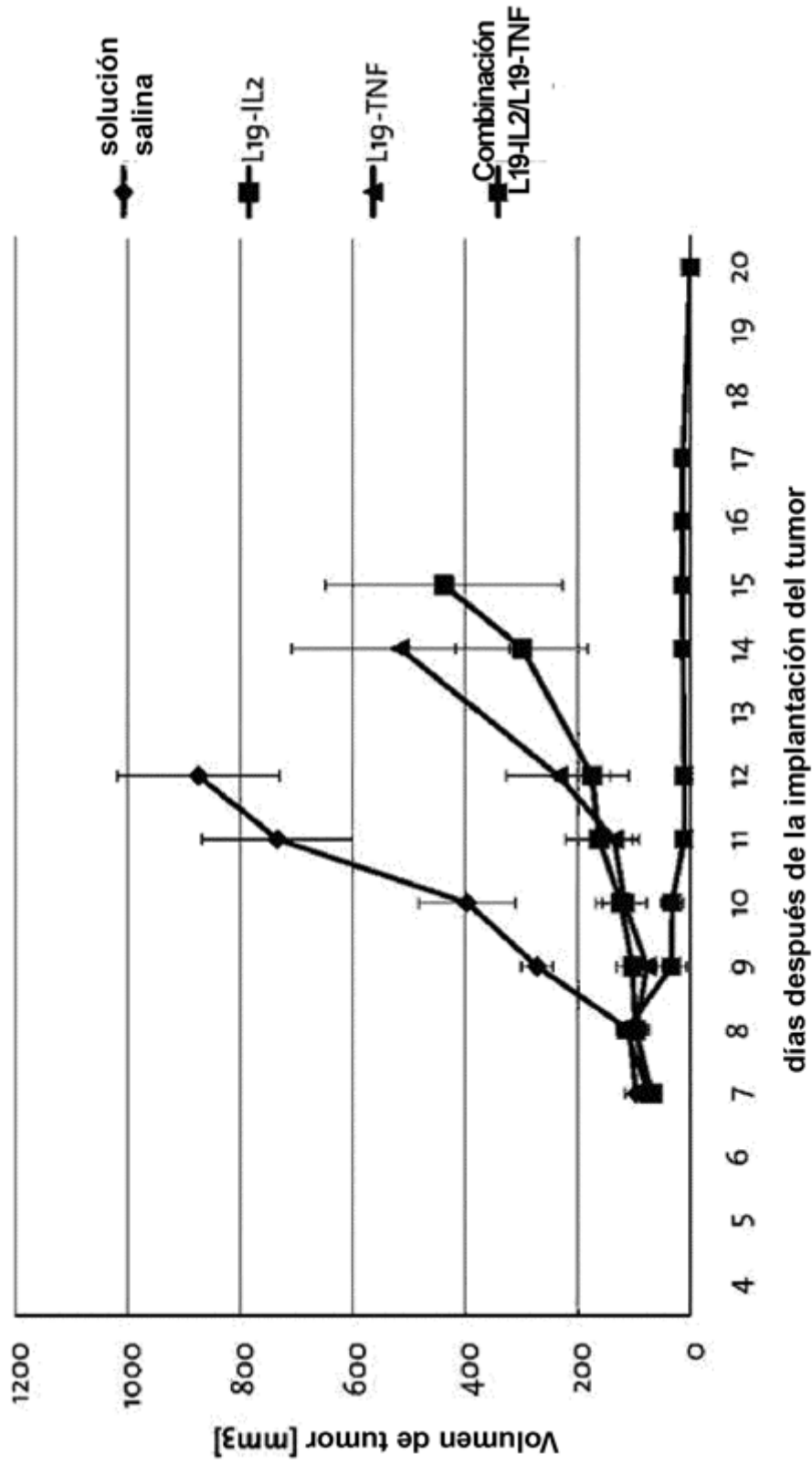


Figura 1A

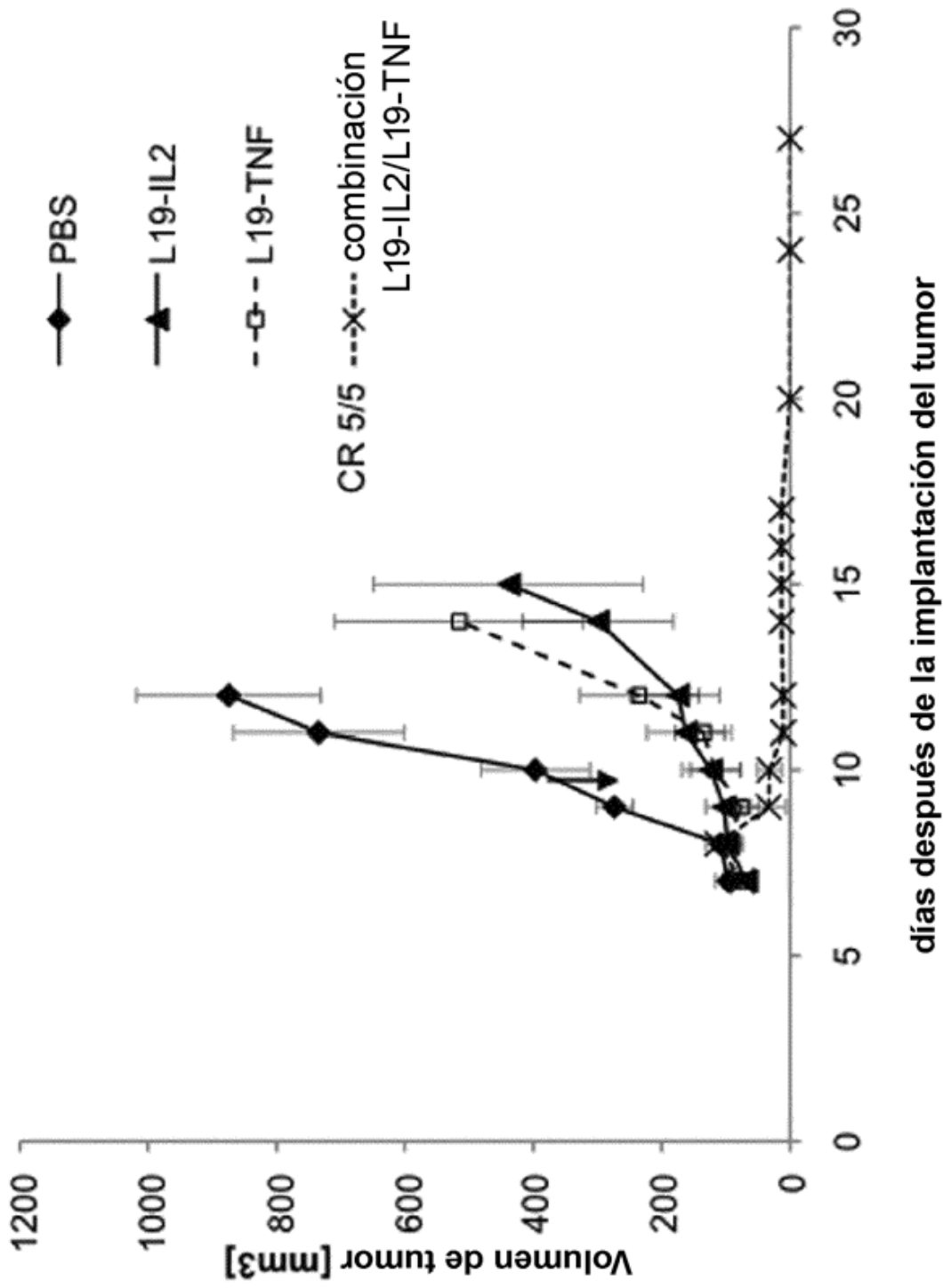


Figura 1B

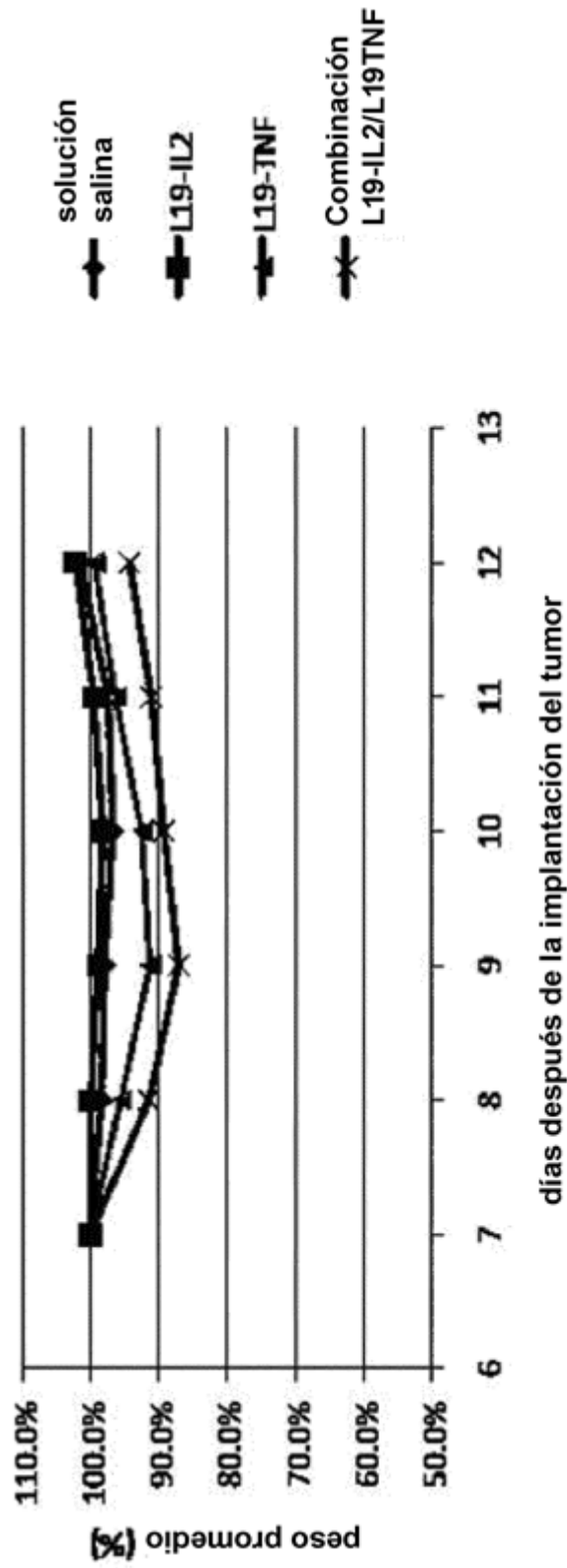


Figura 2

VH
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGITTYADSVKGRFT
CDR1 **CDR2**
CDR3
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFPFYEDYWGQGLVTVSS

LIGADOR
GDGSSGGGGAS

VL
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGS
CDR1 **CDR2**
CDR3
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

Figura 3