

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re.: Expediente No. 06.034.944

Solicitud de Patente de Invención Titulada: "RECONOCIMIENTO DIRIGIDO DE LA VASCULATURA TUMORAL USANDO EL ANTICUERPO L19 CONTRA ED-B DE FIBRONECTINA MARCADO RADIOACTIVAMENTE".

Solicitantes: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT y PHILOGEN S.P.A.

COMPLEMENTO DE INFORMACIÓN

J. IAN RAISBECK mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de los solicitantes de la referencia, me permito allegar a la División información complementaria de la solicitud de Patente de Invención presentada el 10 de abril de 2006.

Atentamente,



J. IAN RAISBECK
C.C. 79.376.996 de Bogotá
T.P. 135.799

Anexo: Documentos complementarios

OLARTE RAISBECK



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Red: 06-034844 -00001-0000 Fax: 2006-04-11 08:52:38
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tte: 11 PATENTERYI Eje 378 FASENACIONALI
Act 328 CTOINFORMACION Folios: 277

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

10.05-2006

1 SOLICITUD DE:		
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.		
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: <u>SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT y PHILOGEN S.P.A.</u> Dirección: <u>Müllerstrasse 178, 13342, Berlin Alemania, y La Lizza 7, 53100 Siena, Italia</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>ALEMANA e ITALIANA</u> Lugar de Constitución: <u>ALEMANIA e ITALIA</u> Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: <u>J. IAN RAISBECK</u> Dirección: <u>World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10</u> Teléfono: <u>601-7700</u> Fax: <u>601-7799</u> E-mail: <u>office@olarteraisbeck.com</u>	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>79.376.996 Btá TP 135.799</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Dirección: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u>	
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2004/009733</u> Fecha <u>Septiembre 1, 2004</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2005/023318</u> Fecha <u>Marzo 17, 2005</u>		
6 Título (54) <u>RECONOCIMIENTO DIRIGIDO DE LA VASCULATURA TUMORAL USANDO EL ANTICUERPO L19 CONTRA ED-B DE FIBRONECTINA MARCADO RADIOACTIVAMENTE.</u>		
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 51/10, A61P 35/00, A61U 51/02, A61U 39/395, 39/44</u>		
8 Prioridad SI ☒ N ☐	(33) País de Origen EP US _____ _____ _____	(32) Fecha Septiembre 10, 2003 Septiembre 10, 2003 _____ _____ _____
	(31) Número de Solicitud 03255633.4 60/501.881 _____ _____ _____	
9 Comprobante de pago No. <u>06- 26.005</u> Fecha <u>Abril , 2006</u>		

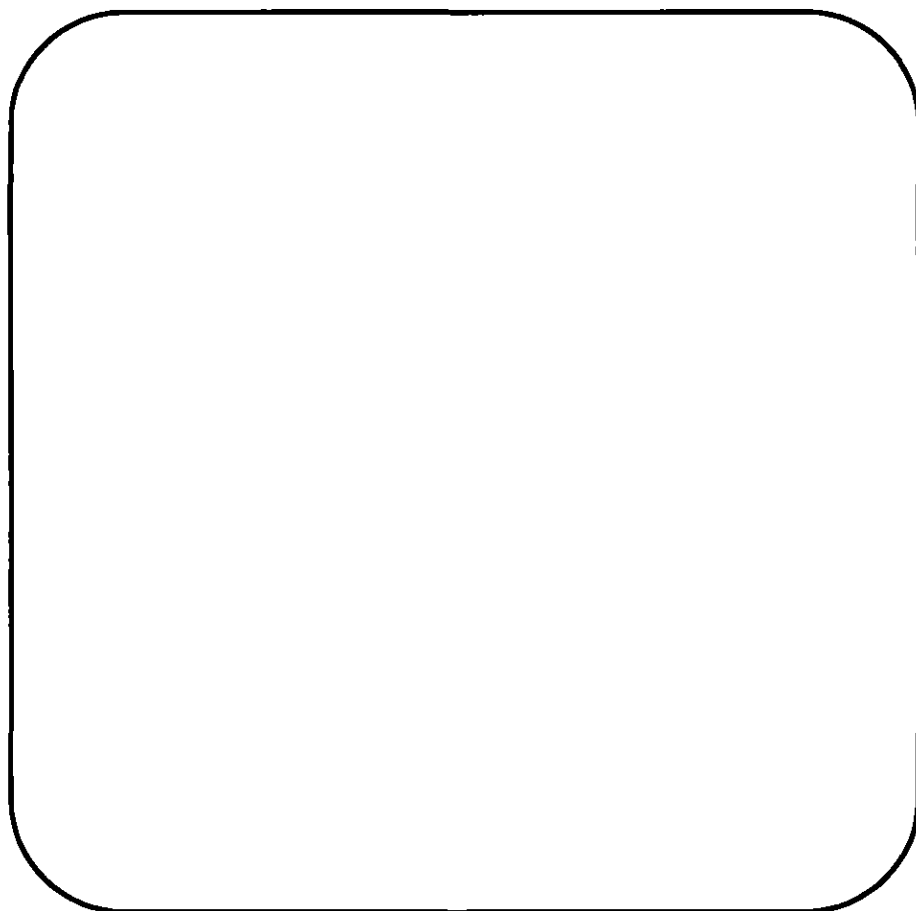
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. IAN RAISBECK

FIRMA:

Jean Raisbeck
C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

Lista de inventores PCT

BORSI Laura
Laboratory of Cell Biology
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia
de nacionalidad italiana

CARNEMOLLA Barbara
Laboratory of Cell Biology
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia
de nacionalidad italiana

BALZA Enrica
Laboratory of Cell Biology
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia
de nacionalidad italiana

CASTELLANI Patrizia
Laboratory of Cell Biology
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia
de nacionalidad italiana

ZARDI Luciano
Laboratory of Cell Biology
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia
de nacionalidad italiana

FRIEBE Matthias
Ruschstrasse 8
13509 Berlin, Alemania
de nacionalidad alemana

HILGER Christoph-Stephan
Langenauer Weg 24
13503 Berlin, Alemania
de nacionalidad alemana

31

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 26,005
FECHA : ABRIL 4 DE 2006

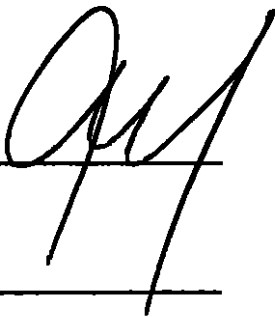
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISDEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	51156209	04/04/2006	7,609,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			TOTAL : \$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



1004947041

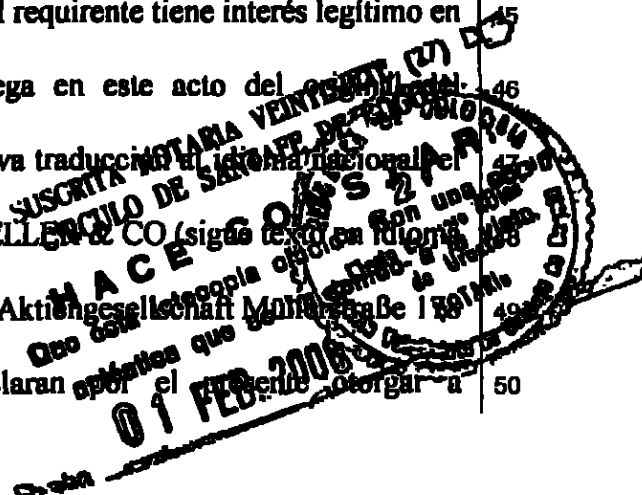
1 FOLIO 189.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CUARENTA Y
2 CINCO.- SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Gerardo a
3 favor de OLARTE, Carlos Reinaldo y otro.- En la Ciudad Autónoma de Buenos
4 Aires, Capital de la República Argentina, el día VEINTITRES de JUNIO del año
5 DOS MIL CINCO, ante mi María Silvina Lasarte, Escribana Autorizante, titular del
6 Registro Notarial número 1788, COMPARECE: Gerardo MESSERER, argentino,
7 mayor de edad, casado en primeras nupcias con Karina Ana Reynolds, titular del
8 Documento Nacional de Identidad número 13.782.654, con domicilio especial en la
9 Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad, persona capaz y de mi
10 conocimiento personal, doy fe.- INTERVIENE: por su propio derecho.- Y
11 EXPRESA: PRIMERO: Que la Sociedad "SCHERING
12 AKTIENGESELLSCHAFT", con domicilio en Müllerstraße 178, 13353 Berlín,
13 Alemania, le confirió el día 7 de Abril de 2.005 en dicho país, un Poder, el cual
14 mediante escritura número 44, de fecha 22 de Junio de 2.005, otorgada ante mí, al
15 folio 186, protocolo corriente, de este Registro Notarial a mi cargo, fue incorporado y
16 transcrito al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista, doy fe y en lo
17 pertinente transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el
18 referido poder invocado se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido
19 revocado, suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- TERCERO: En
20 consecuencia DICE: Que en uso de la facultad conferida a favor de CARLOS REINALDO
21 PARCIALMENTE el poder mencionado a favor de CARLOS REINALDO
22 OLARTE y/o JAMES IAN RAISBECK, al solo y único objeto de que el primero y
23 representación de la Sociedad "SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT",
24 actuando en forma individual, indistinta y/o alternadamente, se presenten
25 exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA que correspondan y realicen los

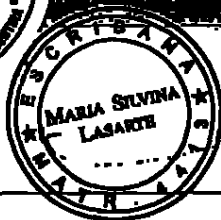
HACE CONFESE
QUE LA AKTIENGESELLSCHAFT
ACTUANDO EN FORMA INDIVIDUAL, INDISTINTA Y/O ALTERNADAMENTE, SE PRESENTEN
EXCLUSIVAMENTE ANTE LAS AUTORIDADES DE COLOMBIA QUE CORRESPONDAN Y REALICEN LOS



N 004947041

actos enumerados en el citado poder y con las facultades que surgen del mismo, el que
transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 186.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA
NÚMERO: CUARENTA Y CUATRO.-- En la Ciudad Autónoma de Buenos
Aires, Capital de la República Argentina, el día VEINTIDÓS de JUNIO del año DOS
MIL CINCO, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Gerardo
MESSERER, argentino, mayor de edad, casado en primeras nupcias con Karina Ana
Reynolds, titular del Documento Nacional de Identidad número 13.782.654, con
domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad,
persona capaz y de mi conocimiento personal, doy fe.- INTERVIENE: por su propio
derecho. Y EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo, del
PODER que le fuera conferido a su favor el día 7 de abril de 2.005, en Berlín,
Alemania, por la Sociedad "SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT", con domicilio
en Müllerstraße 178, 13353 Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde el
requirente bajo juramento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de
poder cuya incorporación y transcripción a este protocolo solicita el compareciente, se
encuentra extendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en
idioma alemán, legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de
La Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por
la Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que el requirente tiene interés legítimo en
su solicitud.- En consecuencia, me hace entrega en este acto del original del
instrumento de poder relacionado con su respectiva traducción al idioma nacional, el
que agrego a la presente y transcripto dice: "MÖLLEN & CO (sigas texto en idioma
extranjero).- Poder Los abajo firmante/s Schering Aktiengesellschaft Müllerstraße 178
13353 Berlin, Germany domiciliados en declaran por el presente otorgar a 50





[Handwritten signature]
N 004947042

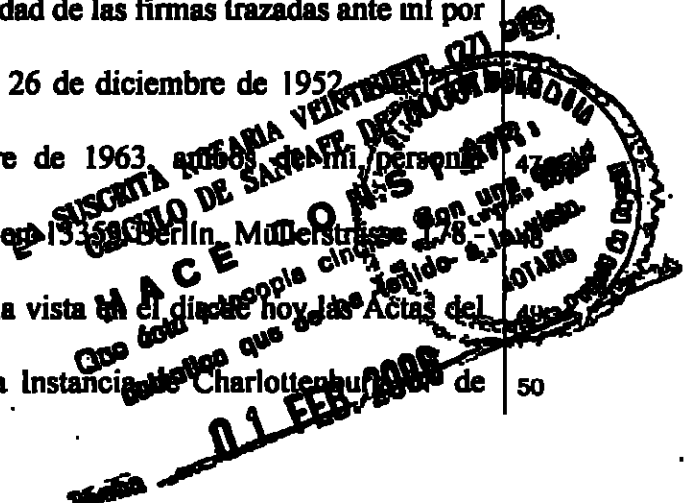
1 GERARDO MESSERER poder general amplio y suficiente para recabar de las
2 autoridades ..., sud y centroamericanas ... que correspondan, la obtención de patentes
3 de invención, el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de
4 propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo efecto lo faculta para llevar a
5 cabo ante dichas autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado,
6 presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones,
7 apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar
8 testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, percibir y hacer
9 cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier orden. Por
10 otra parte, le confiere mandato para que en su nombre y representación puedan iniciar
11 y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro
12 tuvieran en, en Sudamerica, Centroamérica, con motivo de su nombre, marcas
13 de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos de
14 propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover
15 juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales,
16 contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos
17 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por
18 oposición u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el
19 nombre, las marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o
20 nombres de dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo verdad. Al efecto
21 podrá presentarse con escritos, querellas, peticiones, demandas y recursos, ante
22 cualquier autoridad judicial, presentar testigos, documentos y pruebas, rendir
23 pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir absoluciones,
24 posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar jurisdicción, tachar,
25 recusar, apelar, transar, someter a arbitraje, mediar, hacer renunciaciones, exigir y dar

COLEGIO DE ESCRIBANOS DE BOGOTÁ
HACE CONSTAR
FEB. 2004



N. 004947042

cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, 26
pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de 27
sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en 28
general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este 29
mandato. Podrá asimismo substituir el presente poder en todo o en parte. Dado y 30
firmado en Berlin, 2005-04-07 Schering Aktiengesellschaft Corporate Patents ppa. 31
ppa. Hay dos firmas ilegibles Dr. Thomas Seuß Dr. Walter Klose".- ES COPIA FIEL, 32
doy fe.- En hoja adjunta consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el 33
poder, en idioma alemán, efectuada por el Notario de Alemania, Dimitri Rempen y en 34
hoja siguiente consta la legalización de la firma y sello del mencionado notario, en 35
idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 36
1961) doy fe.- A continuación sigue la referida traducción de lo pertinente al idioma 37
nacional la que transcrita textualmente dice: "TRADUCCION PUBLICA (A 38
continuación de un PODER otorgado en idioma nacional por la Sociedad "Schering 39
Aktiengesellschaft", de Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, aparecen los 40
siguientes textos que traducidos dicen:).- La versión en inglés es para su información 41
únicamente.- Registro de Actas Nº R 142/2005 - He advertido sobre la prohibición de 42
colaboración según el Artículo 3, Párrafo 1, Nº 7, de la Ley de Certificaciones. Mi 43
pregunta de que si existe alguna disposición previa en el sentido de dicha Norma, fue 44
contestada negativamente.- Certifico la autenticidad de las firmas trazadas ante mí por
los siguientes:- Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre de 1952
Thomas Seuss, que nació el 17 de setiembre de 1963, ambos con mi persona
conocimiento- ambos con domicilio comercial en Berlín, Müllerstrasse 28
Al mismo tiempo doy fe, en base a que tuve a la vista en el día de hoy las Actas del
Registro de Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg de 50

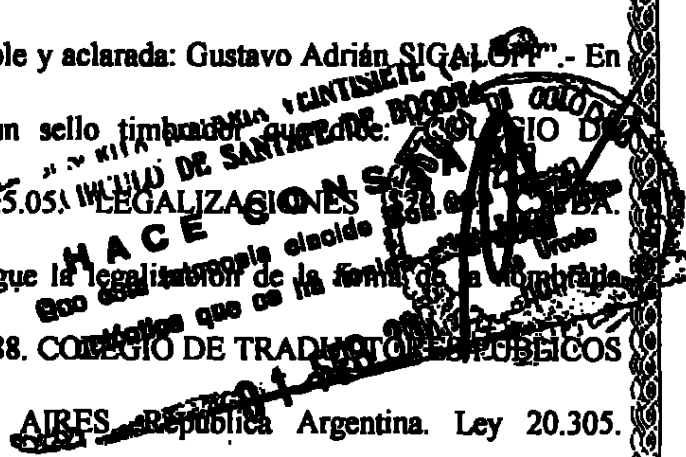




[Handwritten signature]

N 004947043

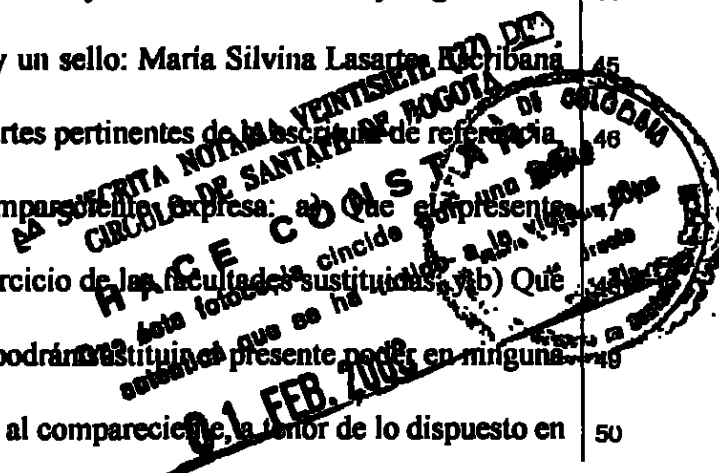
1 Acta HR B 283, que el Dr. Klose y el Dr. Seuss están autorizados en su carácter de
2 Mandatarios a representar a la Sociedad "Schering Aktiengesellschaft" de Berlín.-
3 Berlín, 7 de abril de 2005.- (Firma ilegible del Escribano, liquidación de derechos y
4 sello en oblea aplicado sobre precinto:) TRIBUNAL DE PRIMERA INSTANCIA DE
5 CHARLOTTENBURG - BERLÍN.- APOSTILLA- (Convención de La Haya del 5 de
6 octubre de 1961)- País: República Federal de Alemania.- Este Instrumento público fue
7 firmado por Dimitri Rempen, actuando en carácter de Escribano y lleva el sello del
8 Escribano.-Certificado en Berlín, el 28 de abril de 2005 por el Presidente del Tribunal
9 Regional de Berlín con el N° 9101 a E- F 1927/2005 – Sello (Hay un sello en oblea
10 sobre precinto:) PRESIDENTE DEL TRIBUNAL REGIONAL DE BERLIN- El
11 Funcionario autorizado (Firmado y aclarado:) Bünning – Juez Principal del Tribunal
12 Regional.- ES TRADUCCION FIEL de las partes pertinentes del documento de
13 referencia, que en los idiomas alemán e inglés, he tenido y he vertido al idioma
14 nacional, en Buenos Aires, el 19 de mayo de 2005.- Hay una firma ilegible y un sello
15 que dice: "Laura Thieberger Matrícula de Traductores. Alemán- Francés. Tomo II
16 Folio 254 (Cap.) Tomo III - 98- (La Plata). Inglés. Tomo III - Folio 14 (Cap.) Tomo
17 III - Folio 329 (La Plata) Colegio Traductores Públicos N° 173."- ES COPIA FIEL,
18 doy fe.- A continuación hay un sello que dice: "COLEGIO DE TRADUCTORES
19 PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización
20 N° T5-3258/05. Hay una firma ilegible y aclarada: Gustavo Adrián SIGALOFF".- En
21 el margen superior derecho hay un sello timbrado que dice: "COLEGIO DE
22 TRADUCTORES PÚBLICOS 24.5.05. LEGALIZACIONES".
23 "HACE" A continuación sigue la legalización de la firma de la traductora,
24 traductora, ..., que dice: "N° 00824188. COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS
25 DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES, República Argentina. Ley 20.305.





N 004947043

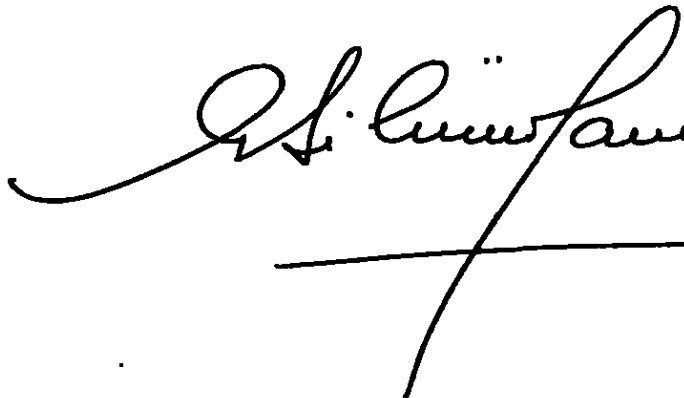
LEGALIZACIÓN. Por la presente el COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS
DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES, en virtud de la facultad que le confiere el
artículo 10, inc. d) de la Ley 20.305, certifica únicamente que la firma y sello que
aparecen en la traducción adjunta, concuerdan con los correspondientes al Traductor
Publico: THIEBERGER, LAURA que obran en los registros de esta institución en el
folio tomo ALEMAN 254 2 INGLES 14 3 Buenos Aires, Legalización Número:
3258/2005/T5 Fecha: 24/05/05.- Hay una firma ilegible. Hay un sello que dice
Marcelo F. Sigaloff Encargado Dto. de Legalizaciones Colegio de Traductores
Públicos de la Ciudad de Buenos Aires.....- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este estado
el compareciente expresa que en la forma expresada deja INCORPORADO y
TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de
mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para el nombrado
apoderado.....- LEO esta escritura al compareciente, quien así la otorga y en prueba
de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- GERARDO MESSERER. Ante mí:
MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su
escritura matriz que pasó ante mí, al folio 186 del Registro Notarial número 1788, a
mi cargo. PARA EL APODERADO expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3)
sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número
N004823958 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su
otorgamiento, doy fe.". Sigue una firma y un sello: María Silvina Lasarte Escribana
Mat. 4413.- ES COPIA FIEL, de las partes pertinentes de la escritura de referencia,
doy fe.- CUARTO: Finalmente el compareciente expresa: a) Que el presente
otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustitutorias, b) Que
los nombrados apoderados sustitutos NO podrán sustituir al presente poder en ninguna
de sus partes.- Yo, la Autorizante advierto al compareciente, a tenor de lo dispuesto en





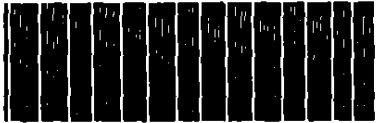
N 004947044

1 el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número 404, respecto de los
2 alcances de las cláusulas contenidas en la presente escritura y del derecho de leer por
3 si este instrumento.- LEO esta escritura al compareciente, quien así la otorga y en
4 prueba de conformidad la firma ante mí, doy fe.- GERARDO MESSERER. Ante mí:
5 MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su
6 escritura matriz que pasó ante mí, al folio 189 del Registro Notarial número 1788, a
7 mi cargo. PARA EL PODERDANTE. expido la presente PRIMERA COPIA en
8 cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número
9 N004947041 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su
10 otorgamiento, doy fe.-

11
12 
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

NOTARIA VEINTISETE (27) DE
DE SANTA DE BOGOTÁ
HACE CONSTAR:
Que esta fotocopia coincide con una
original que se ha tenido a la vista.
01 FEB. 2008
NOTARIO

050623226358



\$30.00

23/06/2006

14:48:41

050623035431



\$30.00

23/06/2006

14:48:48



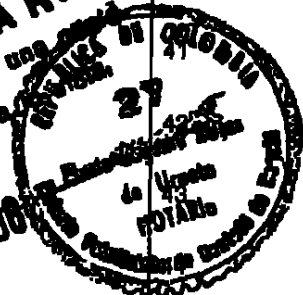
N 004947044

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
45
46
47
48
49
50

ESC
de la
BUE

LA SUSCRITA NOTARIA VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA
HACE CONSTAR:
Que esta fotocopia coincide con una copia
auténtica que se ha tenido a la vista.

01 FEB. 2006



APOSTILLE

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00037959

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por NESTOR ESTEBAN AZLOR

3. Quien actúa en calidad de LEGALIZADOR

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS

AIRES

BANOS

UDAD de

36 AIRES

LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

6. El día 23/06/2005

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 050623035431

9. Sello / Timbre



10. Firma

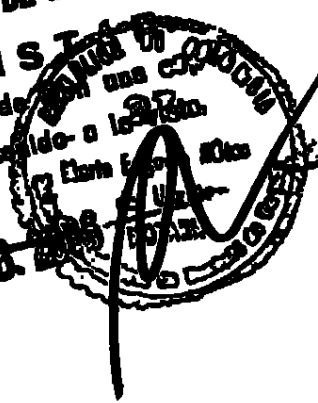
ESC. AUGUSTO M.A. ROSSI (n.)
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO

ASUSCRITA NOTARIA VEINTISETE (27) DE
CIRCULO DE SANTIAGO DE BOGOTÁ

HACE CONSTAR

Que esta fotocopia coincide con una copia
original que se ha tenido a la vista.

01 FEB 2006



37



LEGALIZACION

L 006549485

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma

y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE**

presentes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° **050623226358/6** La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.



Buenos Aires, Jueves 23 de Junio de 2005

ESC. NESTOR ESTEBAN AZLOR
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZADOR

COMUNIDAD MEXICANA - CENTINELA (27) DE
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA
HACE CONSTAR
Que esta fotocopia coincide con una copia
auténtica que se ha tenido a la vista

24 FEB 2005



(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 March 2005 (17.03.2005)

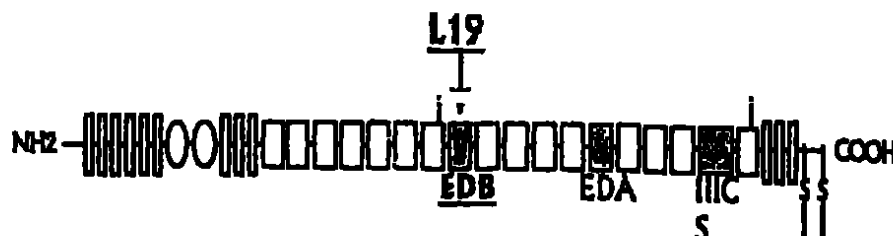
PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/023318 A1

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 51/10, A61P 35/00
- (21) International Application Number:
- (22) International Filing Date:
1 September 2004 (01.09.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
03255633.4 10 September 2003 (10.09.2003) EP
60/501,881 10 September 2003 (10.09.2003) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): PHILOGEN S.p.A. [IT/IT]; La Lizza 7, I-53100 Siena (IT). SCHERING AG [DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).
- (72) Inventors: and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): BORSI, Laura [IT/IT]; Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova (IT). CARNEMOLLA, Barbara [IT/IT]; Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul
- (74) Agents: WALTON, Sofia et al.; Mewburn Ellis LLP, York House, 23 Kingsway, London Greater London WC2B 6HP (GB).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AU, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: TARGETING OF TUMOR VASCULATURE USING RADIOLABELLED ANTIBODY L19 AGAINST FIBRONECTIN ED-B



(57) Abstract: A specific binding member that binds human ED-B, wherein the specific binding member is labelled with an isotope selected from the group consisting of ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I and ²¹¹At and comprises an antigen-binding site that comprises an antibody VH domain and an antibody VL domain, wherein the antibody VH domain is selected from the group consisting of the L19 VH domain, and a VH domain comprising a VH CDR1, a VH CDR2 and a VH CDR3, wherein the VH CDR3 is the L19 VH CDR3 of SEQ ID NO. 3, the VH CDR1 is optionally L19 VH CDR1 of SEQ ID NO. 1, and the VH CDR2 is optionally L19 VH CDR2 of SEQ ID NO. 2; and wherein the antibody VL domain is optionally selected from the group consisting of the L19 VL domain, and a VL domain comprising a VL CDR1, a VL CDR2 and a VL CDR3, wherein the VL CDR3 is the L19 VL CDR3 of SEQ ID NO. 6, the VL CDR1 is optionally L19 VL CDR1 of SEQ ID NO. 4, and the VL CDR2 is optionally L19 VL CDR2 of SEQ ID NO. 5; the L19 VH domain and L19 VL domain sequences being disclosed in Pini et al. (1999) J. Biol. Chem. 273: 21767-21776; wherein the specific binding member comprises a mini-immunoglobulin comprising said antibody VH domain and antibody VL domain fused to cS2-CH4 and dimerized or comprises a whole IgG1 antibody molecule; also methods and uses employing such a specific binding member.



(B4) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KH, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— with international search report

TARGETING OF TUMOR VASCULATURE USING RADIOLABELLED ANTIBODY L19 AGAINST FIBRONECTIN ED-B

The present invention relates to targeting of tumor vasculature using radiolabelled antibody molecules. In particular, the invention relates to use of antibody molecules that bind ED-B of fibronectin, and which are of demonstrated usefulness in tumor targeting. In different embodiments of the present invention, antibody molecules are employed in different molecular formats. In certain embodiments the antibody molecules comprise human IgG1. In other embodiments the antibody molecules are mini-immunoglobulins, such as are generated by fusing an scFv antibody molecule to the constant CH4 domain of a secretory IgE isoform that naturally contains a cysteine in its COOH terminal which forms a covalently linked dimer. Blood clearance rate, *in vivo* stability and other advantageous properties are employed in different aspects and embodiments of the invention, e.g. in tumor targeting. The different *in vivo* behavior of different antibody molecule formats may be exploited for different diagnostic and/or therapeutic purposes, depending on clinical needs and disease.

Despite their enormous potential as therapeutic agents, monoclonal antibodies (mAbs) of non-human origin have performed poorly in clinical trials as a result of their immunogenicity (1 Shawlert et al., 1985; 2 Miller et al., 1983), poor pharmacokinetic properties (3 Hakimi et al., 1991; 4 Stephens et al., 1995) and inefficiency in recruiting effector functions (5 Riechmann et al., 1988; 6 Junghens et al., 1990). The recent prospect of isolating human antibody fragments from phage display libraries (7 McCafferty et al., 1990; 8 Lowman et al., 1991; for reviews see 9 Nilsson et al.,

2000 and 10 Winter et al., 1994) transcends these problems, revitalizing studies and rekindling hopes of using these reagents to treat major diseases. Indeed, these molecules should serve as ideal building blocks for novel diagnostic and therapeutic tools (11 Reichert, 2001; 12 Huls et al., 1999). Furthermore, these antibodies can be "matured" to reach affinities in the picomolar range (13 Pini et al., 1998), at least desirable, if not necessary, for their clinical use.

Clinical applications of human antibody fragments for the selective delivery of diagnostic or therapeutic agents nonetheless require highly specific targets. In the case of tumors, the most popular targets are cell-surface antigens, which are usually neither abundant nor stable. Nevertheless, during tumor progression, the microenvironment surrounding tumor cells undergoes extensive modification that generates a "tumoral environment" which represents a target for antibody-based tumor therapy (14 Neri and Zardi, 1998). In fact, the concept that the altered tumor microenvironment is itself a carcinogen that can be targeted is increasingly gaining consensus. Molecules that are able to effectively deliver therapeutic agents to the tumor microenvironment thus represent promising and important new tools for cancer therapy (15 Bissel, 2001; 14 Neri and Zardi, 1998).

Fibronectin is an extracellular matrix (ECM) component that is widely expressed in a variety of normal tissues and body fluids. Different FN isoforms can be generated by the alternative splicing of the FN pre-mRNA, a process that is modulated by cytokines and extracellular pH (16 Balza et al., 1988; 17 Carnemolla et al., 1989; 18 Borsi et al., 1990; 19 Borsi et al., 1995). The complete type III repeat ED-B, also known as the extratype III repeat B (EIIIB), may be entirely

included or omitted in the FN molecule (20 Zardi et al., 1987). ED-B is highly conserved in different species, having 100% homology in all mammals thus far studied (human, rat, mouse, dog) and 96% homology with a similar domain in chicken.

5 The FN isoform containing ED-B (B-FN) is undetectable immunohistochemically in normal adult tissues, with the exception of tissues undergoing physiological remodelling (e.g., endometrium and ovary) and during wound healing (17 Carnemolla et al., 1989; 21 French-Constant, et al., 1989).
10 By contrast, its expression in tumors and fetal tissues is high (17 Carnemolla et al., 1989). Furthermore, it has been demonstrated that B-FN is a marker of angiogenesis (22 Castellani et al., 1994) and that endothelial cells invading tumor tissues migrate along ECM fibers containing B-FN (23
.5 Tarli et al. 1999).

Selective targeting of tumoral vasculature has been described using a human recombinant antibody, scFv(L19) (13 Pini et al., 98), specific for the B-FN isoform (24 Carnemolla et al.,
20 1996; 23 Tarli et al., 99; 25 Viti et al., 99; 26 Neri et al., 97; 27 Demartis et al., 2001). The antibody may be used in both *in vivo* diagnostic (immunoscintigraphy) and therapeutic approaches entailing the selective delivery of therapeutic radionuclides or toxic agents to tumoral vasculature. In
25 addition, Birchler et al. (28 1999) showed that scFv(L19), chemically coupled to a photosensitizer, selectively accumulates in the newly formed blood vessels of the angiogenic rabbit cornea model and, after irradiation with near infrared light, mediates complete and selective occlusion
30 of ocular neovasculature.

More recently, Nilsson et al. (29 2001) reported that the immunoconjugate of scFv(L19) with the extracellular domain of

~~15~~
43

tissue factor mediates selective infarction in different types of murine tumor models. Furthermore, fusion proteins of scFv(L19) and IL-2 or IL-12 have shown the enhanced therapeutic efficacy of these two cytokines (30 Halin et al., submitted; 31 Carnemolla et al., 2002). See also WO01/62298 for use of fusions in treatment of lesions of pathological angiogenesis, including tumors. Finally, since L19 reacts equally well with mouse and human ED-B, it can be used for both pre-clinical and clinical studies.

See also PCT/GB97/01412, PCT/EP99/03210, PCT/EP01/02062 and PCT/IB01/00382.

Different antibody formats have shown diverse behavior in terms of *in vivo* stability, clearance and performance in tumor targeting (32 Wu et al., 2000). A mini-immunoglobulin or small immunoprotein (SIP) is described in (33 Li et al., 1997).

The present invention is based on preparation of, characterization of and investigation of the *in vivo* biodistribution of L19 human antibody molecules in different formats, namely, scFv, mini-immunoglobulin and complete IgG1, and labelling with radioisotopes.

Brief Description of the Figures

Figure 1 shows models illustrating the structures of different proteins. A: Model of the domain structure of a FN subunit.

The protein sequences undergoing alternative splicing are indicated in grey. As indicated, the epitope of the recombinant antibody L19 is localized within the repeat ED-B.

46
44

B - D: Schemes of the constructs used to express, respectively, L19 (scFv) (B); L19-SIP (C); and L19-IgG1/k.

Figure 2 shows growth curves of SK-MEL-28 tumor in nude mice (triangles) and of F9 tumor in 129 mouse strain (circles). The volume (mm³) is plotted versus time (days). Each data point is the average of six mice $\pm$ SD.

Figure 3 shows the results of size exclusion chromatography on the different L19 formats. In panels A, B and C are shown size exclusion chromatography (Superdex 200) profiles of the L19 formats scFv, mini-immunoglobulin and IgG1, respectively, after radioiodination. Panels D, E and F show size exclusion chromatography (Superdex 200) profiles of plasma at the indicated times after i.v. injection of the radioiodinated L19 formats, scFv, mini-immunoglobulin and IgG1, respectively. No changes in the curve profiles of L19-SIP or L19-IgG1 were detected when loading plasma at different times after injection, while 3h after L19(scFv)2 injection a second peak of higher molecular mass was observed.

Figure 4 shows results of biodistribution experiments in SK-MEL-28 tumor-bearing mice using different radioiodinated L19 antibody molecule formats. The variations of the %ID/g in the tumor (Figure 4A) and in the blood (Figure 4B) at the indicated times after i.v. injection are reported. In Figure 4C the tumor-blood ratios of the %ID/g are plotted. The curves of L19(scFv) are indicated by diamonds, of L19 mini-immunoglobulin by squares and of L19 IgG1 by triangles.

Figure 5 shows results of biodistribution experiments in F9 tumor-bearing mice using radioiodinated L19(scFv) (squares)

XZ
45

and L19 mini-immunoglobulin (diamonds). The variations of the %ID/g in the tumor (A) and in the blood (B), at the indicated different times after i.v. injection are reported.

- 5 Figure 6 shows change in U251 tumor area (square millimetres) over time (days) post injection of physiological saline and I-131-L19-SIP respectively.

The present invention relates to specific binding members that
10 bind human ED-B of fibronectin, wherein the specific binding members are radiolabelled with one or more isotopes selected from the group consisting of ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I and ^{211}At . The invention also provides methods of producing such specific binding members, and their use in diagnostic and therapeutic
15 applications.

Specific binding members of the invention showed favorable properties in animal experiments, such as higher doses delivered to tumor compared to red marrow, and high tumor accumulation.

10

- In one aspect, the present invention provides a specific binding member which binds human ED-B of fibronectin and which comprises the L19 VH domain and a VL domain, optionally the L19 VL domain, wherein the specific binding member comprises a
5 mini-immunoglobulin comprising said antibody VH domain and antibody VL domain fused to ϵ_{H2} -CH4 and dimerized or comprises a whole IgG1 antibody molecule, and wherein the specific binding member is radiolabelled with an isotope selected from the group consisting of ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I and ^{211}At .
0 Preferably, the radioisotope is ^{123}I or ^{131}I , and most preferably ^{131}I .

78
46

A radiolabel or radiolabelled molecule may be attached to the specific binding member may be labelled at e.g. a tyrosine, lysine or cysteine residue.

5 The L19 VH domain and L19 VL domain sequences are set out in Pini et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273: 21769-21776, those sequences being fully incorporated herein by reference to Pini et al. as if set out here.

10 Generally, a VH domain is paired with a VL domain to provide an antibody antigen binding site. In a preferred embodiment, the L19 VH domain is paired with the L19 VL domain, so that an antibody antigen binding site is formed comprising both the L19 VH and VL domains. In other embodiments, the L19 VH is
15 paired with a VL domain other than the L19 VL. Light-chain promiscuity is well established in the art.

One or more CDRs may be taken from the L19 VH or VL domain and incorporated into a suitable framework. This is discussed
20 further below. L19 VH CDR's 1, 2 and 3 are shown in SEQ ID NO.'s 1, 2, and 3, respectively. L19 VL CDR's 1, 2 and 3 are shown in SEQ ID NO.'s 1, 2 and 3, respectively.

In a preferred embodiment, the specific binding member is L19-SIP, most preferably ¹²³I-labelled L19-SIP (herein referred to
25 as I-123-L19-SIP) or ¹³¹I-labelled L19-SIP (herein referred to as I-131-L19-SIP).

Variants of the VH and VL domains and CDRs of which the
30 sequences are set out herein and which can be employed in specific binding members for ED-B can be obtained by means of methods of sequence alteration or mutation and screening.

47

Variable domain amino acid sequence variants of any of the VH and VL domains whose sequences are specifically disclosed herein may be employed in accordance with the present invention, as discussed. Particular variants may include one or more amino acid sequence alterations (addition, deletion, substitution and/or insertion of an amino acid residue), maybe less than about 20 alterations, less than about 15 alterations, less than about 10 alterations or less than about 5 alterations, 4, 3, 2 or 1. Alterations may be made in one or more framework regions and/or one or more CDR's.

A specific binding member according to the invention may be one which competes for binding to antigen with a specific binding member which both binds ED-B and comprises an antigen-binding site formed of the L19 VH domain and L19 VL domain. Competition between binding members may be assayed easily in vitro, for example using ELISA and/or by tagging a specific reporter molecule to one binding member which can be detected in the presence of other untagged binding member(s), to enable identification of specific binding members which bind the same epitope or an overlapping epitope.

Thus, further aspects of the present invention employ a specific binding member comprising a human antibody antigen-binding site which competes with L19 for binding to ED-B.

A specific binding member according to the present invention may bind ED-B with at least the affinity of L19, binding affinity of different specific binding members being compared under appropriate conditions.

In addition to antibody sequences, a specific binding member according to the present invention may comprise other amino

acids, e.g. forming a peptide or polypeptide, such as a folded domain, or to impart to the molecule another functional characteristic in addition to ability to bind antigen.

Specific binding members of the invention may carry a
5 detectable label, or may be conjugated to a toxin or enzyme (e.g. via a peptidyl bond or linker).

In treatment of disorders or lesions of pathological angiogenesis, a specific binding member of the invention may
10 be conjugated to a toxic molecule, for instance a biocidal or cytotoxic molecule that may be selected from interleukin-2 (IL-2), doxorubicin, interleukin-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and tissue factor (preferably truncated tissue factor, e.g. to residues 1-219).
15 See e.g. WO01/62298.

Specific binding members according to the invention may be used in a method of treatment or diagnosis of the human or animal body, such as a method of treatment (which may include
20 prophylactic treatment) of a disease or disorder in a human patient which comprises administering to said patient an effective amount of a specific binding member of the invention. Preferably, a specific binding member according to the invention is administered to the patient by parenteral
25 administration. Conditions treatable in accordance with the present invention include tumors, especially solid tumors, and other lesions of pathological angiogenesis, including, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, and angiomas.

0

Specific binding members are well suited for radiolabelling with isotopes selected from the group consisting of ^{76}Br , ^{77}Br ,

.8/
49

^{123}I , ^{124}I , ^{131}I and ^{211}At and subsequent use in radiodiagnosis and radiotherapy.

5 A yet further aspect provides a method of producing a specific binding member of the invention, comprising labelling a specific binding member with a radioisotope selected from the group consisting of ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I and ^{211}At .

0 To radiolabel the specific binding member directly, tyrosine moieties in the molecule may be targeted. In this particular procedure, the halogenide, e.g. Br^- , I^- , At^- is oxidised by an appropriate oxidant, e.g. iodogen® (coated tubes), Iodo-Beads, chloramine-T (sodium salt of *N*-chloro-*p*-toluenesulfonamide) etc. in the presence of the active pharmaceutical ingredient
5 (API).

Indirect labelling with e.g. bromine, iodine or astatine may be performed by pre-labelling a bi-functional halogen carrier, preferably derived from e.g. benzoic acid derivatives, Bolton-Hunter derivatives, benzene derivatives etc. The carrier may be
0 transformed into an activated species to be conjugated to the ϵ -amino group of Lysine residues or the N-terminus of the API. This indirect method also provides a synthetic route to radiolabel the peptide compounds chemo-selectively at the
5 sulfhydryl group of a cysteine moiety. The cysteine bridged molecules may first be reduced by an appropriate reducing agent e.g. stannous(II)chloride, Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) generating free cysteine SH-groups that can react with the halogen carrier. As functional groups for the binding maleimide
and α -brom acetamide derivatives may be employed.

22
50

A method of producing a specific binding member according to the invention may comprise expressing nucleic acid encoding the specific binding member prior to labelling the specific binding member. Thus, as an earlier step, the method of
5 producing the specific binding member may optionally comprise causing or allowing expression from encoding nucleic acid, i.e. nucleic acid comprising a sequence encoding the specific binding member. Such a method may comprise culturing host cells under conditions for production of said specific binding
.0 member.

A method of production may comprise a step of isolation and/or purification of the product. The specific binding member may be isolated and/or purified following expression from nucleic
5 acid, and/or recovery from host cells. The isolation and/or purification may be prior to labelling. Alternatively or additionally, the specific binding member may be isolated and/or purified after labelling.

0 A method of production may comprise formulating the product into a composition including at least one additional component, such as a pharmaceutically acceptable excipient. Thus, the (labelled) specific binding member may be formulated into a composition including at least one additional component
5 such as a pharmaceutically acceptable excipient.

These and other aspects of the invention are described in further detail below.

TERMINOLOGY

Specific binding member

This describes a member of a pair of molecules which have
5 binding specificity for one another. The members of a
specific binding pair may be naturally derived or wholly or
partially synthetically produced. One member of the pair of
molecules has an area on its surface, or a cavity, which
specifically binds to and is therefore complementary to a
10 particular spatial and polar organisation of the other member
of the pair of molecules. Thus the members of the pair have
the property of binding specifically to each other. Examples
of types of specific binding pairs are antigen-antibody,
biotin-avidin, hormone-hormone receptor, receptor-ligand,
.5 enzyme-substrate. This application is concerned with
antigen-antibody type reactions.

Antibody molecule

This describes an immunoglobulin whether natural or partly or
0 wholly synthetically produced. The term also covers any
polypeptide or protein comprising an antibody binding domain.
Antibody fragments which comprise an antigen binding domain
are such as Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; and diabodies. The
present invention is concerned with whole IgG1 antibody
5 molecules and mini-immunoglobulins comprising ϵ_{82} -CH4 as
disclosed.

Techniques of recombinant DNA technology may be used to
produce from an initial antibody molecule other antibody
0 molecules which retain the specificity of the original
antibody molecule. Such techniques may involve introducing
DNA encoding the immunoglobulin variable region, or the
complementarity determining regions (CDRs), of an antibody to

the constant regions, or constant regions plus framework regions, of a different immunoglobulin. See, for instance, EP-A-184187, GB 2188638A or EP-A-239400.

5 As antibodies can be modified in a number of ways, the term "antibody molecule" should be construed as covering any specific binding member or substance having an antibody antigen-binding domain with the required specificity. Thus, this term covers antibody fragments and derivatives, including
.0 any polypeptide comprising an immunoglobulin antigen-binding domain, whether natural or wholly or partially synthetic. Chimeric molecules comprising an immunoglobulin binding domain, or equivalent, fused to another polypeptide are therefore included. Cloning and expression of chimeric
.5 antibodies are described in EP-A-0120694 and EP-A-0125023.

Antigen binding domain

This describes the part of an antibody molecule which comprises the area which specifically binds to and is
0 complementary to part or all of an antigen. Where an antigen is large, an antibody may only bind to a particular part of the antigen, which part is termed an epitope. An antigen binding domain may be provided by one or more antibody variable domains (e.g. a so-called Fd antibody fragment
5 consisting of a VH domain). Preferably, an antigen binding domain comprises an antibody light chain variable region (VL) and an antibody heavy chain variable region (VH).

Specific

0 This may be used to refer to the situation in which one member of a specific binding pair will not show any significant binding to molecules other than its specific binding partner(s). The term is also applicable where e.g. an antigen

85
53

binding domain is specific for a particular epitope which is carried by a number of antigens, in which case the specific binding member carrying the antigen binding domain will be able to bind to the various antigens carrying the epitope.

5

Comprise

This is generally used in the sense of include, that is to say permitting the presence of one or more features or components.

0 *Isolated*

This refers to the state in which specific binding members of the invention, or nucleic acid encoding such binding members, will generally be in accordance with the present invention. Members and nucleic acid will be free or substantially free of material with which they are naturally associated such as other polypeptides or nucleic acids with which they are found in their natural environment, or the environment in which they are prepared (e.g. cell culture) when such preparation is by recombinant DNA technology practised *in vitro* or *in vivo*.

5 Members and nucleic acid may be formulated with diluents or adjuvants and still for practical purposes be isolated - for example the members will normally be mixed with gelatin or other carriers if used to coat microtitre plates for use in immunoassays, or will be mixed with pharmaceutically acceptable carriers or diluents when used in diagnosis or therapy. Specific binding members may be glycosylated, either naturally or by systems of heterologous eukaryotic cells (e.g. CHO or NS0 (ECACC 85110503) cells, or they may be (for example if produced by expression in a prokaryotic cell) unglycosylated.

By "substantially as set out" it is meant that the relevant CDR or VH or VL domain of the invention will be either

26
54

identical or highly similar to the specified regions of which the sequence is set out herein. By "highly similar" it is contemplated that from 1 to 5, preferably from 1 to 4 such as 1 to 3 or 1 or 2, or 3 or 4, substitutions may be made in the
5 CDR and/or VH or VL domain.

The structure for carrying a CDR of the invention will generally be of an antibody heavy or light chain sequence or substantial portion thereof in which the CDR is located at a
.0 location corresponding to the CDR of naturally occurring VH and VL antibody variable domains encoded by rearranged immunoglobulin genes. The structures and locations of immunoglobulin variable domains may be determined by reference to (Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological
5 Interest. 5th Edition. US Department of Health and Human Services. 1991, and updates thereof, now available on the Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> or find "Kabat" using any search engine).

0 Preferably, a CDR amino acid sequence substantially as set out herein is carried as a CDR in a human variable domain or a substantial portion thereof. The L19 VH CDR3 and/or L19 VL CDR3 sequences substantially as set out herein may be used in preferred embodiments of the present invention and it is
5 preferred that each of these is carried as a CDR3 in a human heavy or light chain variable domain, as the case may be, or a substantial portion thereof.

A substantial portion of an immunoglobulin variable domain
) will comprise at least the three CDR regions, together with their intervening framework regions. Preferably, the portion will also include at least about 50% of either or both of the first and fourth framework regions, the 50% being the C-

27
SS

terminal 50% of the first framework region and the N-terminal 50% of the fourth framework region. Additional residues at the N-terminal or C-terminal end of the substantial part of the variable domain may be those not normally associated with naturally occurring variable domain regions. For example, construction of specific binding members of the present invention made by recombinant DNA techniques may result in the introduction of N- or C-terminal residues encoded by linkers introduced to facilitate cloning or other manipulation steps. Other manipulation steps include the introduction of linkers to join variable domains of the invention to further protein sequences including immunoglobulin heavy chains, other variable domains or protein labels as discussed in more details below.

In an IgG1 antibody molecule according to the present invention, VL domains may be attached at the C-terminal end to antibody light chain constant domains including human C κ or C λ chains, preferably C κ chains.

In addition to being labelled with ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I and/or ^{211}At , specific binding members of the invention may be labelled with a second detectable or functional label. Detectable labels are described below and include radiolabels such as radioisotopes of Technetium, Indium, Yttrium, Copper, Lutetium or Rhenium, in particular $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re , ^{188}Re , ^{111}In , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{177}Lu , ^{64}Cu and ^{67}Cu , which may be attached to antibodies of the invention using conventional chemistry known in the art of antibody imaging as described herein. Other radioisotopes that may be used include ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{43}Sc , ^{47}Sc , $^{110\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{68}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{121}Sn , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{105}Rh , ^{177}Lu , ^{72}Lu and ^{18}F .

Labels also include enzyme labels such as horseradish peroxidase. Labels further include chemical moieties such as biotin which may be detected via binding to a specific cognate detectable moiety, e.g. labelled avidin.

5

An example labelling protocol is as follows:

To radiolabel the specific binding members directly, the cysteine bridged molecules are first reduced by an appropriate
.0 reducing agent e.g. stannous(II)chloride, Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) generating free cysteine SH-groups that can react with isotopes e.g. Tc or Re. In this particular procedure, the permetalates obtained from an instant generator system are reduced by a reducing agent e.g. stannous(II)chloride
.5 in the presence of an auxillary ligand e.g. sodium tartrate and the API (details are provided below in the experimental section).

Indirect labeling with e.g. indium, yttrium, lanthanides or
0 technetium and rhenium may be performed by pre-conjugating a chelating ligand, preferably derived from ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), cyclohexyl 1,2-diamine tetraacetic acid (CDTA), ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-diacetic acid
5 (HBED), triethylene tetraamine hexaacetic acid (TTHA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA), 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid (NOTA), 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (TETA), mercaptoacetyl diglycine (MAG₂), mercaptoacetyl triglycine
0 (MAG₃), mercaptoacetyl glycyl cysteine (MAGC), cysteinyl glycyl cysteine (CGC) to either amine or thiol groups of the specific binding member. The chelating ligands possess a suitable coupling group e.g. active esters, maleimides, thiocarbamates or

29
57

α -halogenated acetamide moieties. For conjugating chelating ligands to amine groups e.g. ϵ -NH₂-groups of lysine residues previous reduction of the L-19-SIP compound is not required.

- 5 Methods of labelling a specific binding member may comprise conjugating an activated bi-functional halogen carrier containing a radioisotope selected from the group consisting of ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I and ²¹¹At to a lysine residue or N terminus, and to a cysteine residue of the specific binding
- 10 member. The method may comprise conjugating the halogen carrier to a lysine or cysteine residue of the specific binding member, or to the N terminus of the specific binding member. Either or both of (i) a cysteine residue and (ii) a lysine residue or the N terminus, may be labelled with the
- .5 same or a different radioisotope according to the invention.

Specific binding members of the present invention are designed to be used in methods of diagnosis or treatment in human or animal subjects, preferably human. The specific binding

10 members are especially suitable for use in methods of radiotherapy and radiodiagnosis.

Accordingly, further aspects of the invention provide methods of treatment comprising administration of a specific binding

15 member as provided, pharmaceutical compositions comprising such a specific binding member, and use of such a specific binding member in the manufacture of a medicament for administration, for example in a method of making a medicament or pharmaceutical composition comprising formulating the

20 specific binding member with a pharmaceutically acceptable excipient.

Clinical indications in which a specific binding member of the invention may be used to provide therapeutic benefit include tumors such as any solid tumor, also other lesions of pathological angiogenesis, including rheumatoid arthritis,
5 diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, and angiomas.

Specific binding members according to the invention may be used in a method of treatment of the human or animal body,
10 such as a method of treatment (which may include prophylactic treatment) of a disease or disorder in a human patient which comprises administering to said patient an effective amount of a specific binding member of the invention. Preferably, the treatment is radiotherapy. Conditions treatable in accordance
15 with the present invention are discussed elsewhere herein.

Specific binding members according to the invention may be used in SPECT imaging, PET imaging and therapy. Preferred isotopes for SPECT imaging include ^{123}I and ^{131}I . A preferred
20 isotope for PET is ^{124}I . ^{131}I is a preferred isotope for use in therapy.

Due to the use of different isotopes of one element for imaging and therapy the biodistribution of the respective
25 immunoconjugates is identical. This is an advantage compared with other approaches which are using ^{111}In -labeled derivatives for imaging in order to predict the biodistribution of the respective ^{90}Y -labeled therapeutic derivatives because the biodistribution of corresponding ^{111}In and ^{90}Y labeled
30 derivatives could be different; see Carrasquillo J.A. et al. (1999) J Nucl Med 40: 268-276.

Accordingly, further aspects of the invention provide methods of treatment comprising administration of a specific binding member as provided, pharmaceutical compositions comprising such a specific binding member, and use of such a specific binding member in the manufacture of a medicament for administration, for example in a method of making a medicament or pharmaceutical composition comprising formulating the specific binding member with a pharmaceutically acceptable excipient.

In accordance with the present invention, compositions provided may be administered to individuals. Administration is preferably in a "therapeutically effective amount", this being sufficient to show benefit to a patient. Such benefit may be at least amelioration of at least one symptom. The actual amount administered, and rate and time-course of administration, will depend on the nature and severity of what is being treated. Prescription of treatment, e.g. decisions on dosage etc, is within the responsibility of general practitioners and other medical doctors. Appropriate doses of antibody are well known in the art; see Ledermann J.A. et al. (1991) Int J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922.

A composition may be administered alone or in combination with other treatments, either simultaneously or sequentially dependent upon the condition to be treated.

Specific binding members of the present invention, including those comprising an antibody antigen-binding domain, may be administered to a patient in need of treatment via any suitable route, usually by injection into the bloodstream

and/or directly into the site to be treated, e.g. tumor. Preferably, the specific binding member is parenterally administered. The precise dose will depend upon a number of factors, the route of treatment, the size and location of the area to be treated (e.g. tumor), the precise nature of the antibody (e.g. whole IgG1 antibody molecule, mini-immunoglobulin molecule), and the nature of any detectable label or other molecule attached to the antibody molecule. A typical antibody dose will be in the range 10-50 mg.

This is a dose for a single treatment of an adult patient, which may be proportionally adjusted for children and infants, and also adjusted for other antibody formats in proportion to molecular weight. Treatments may be repeated at daily, twice-weekly, weekly or monthly intervals, at the discretion of the physician.

Specific binding members of the present invention will usually be administered in the form of a pharmaceutical composition, which may comprise at least one component in addition to the specific binding member.

Thus pharmaceutical compositions according to the present invention, and for use in accordance with the present invention, may comprise, in addition to active ingredient, a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, buffer, stabiliser or other materials well known to those skilled in the art. Such materials should be non-toxic and should not interfere with the efficacy of the active ingredient. The precise nature of the carrier or other material will depend on the route of administration, which may be oral, or by injection, e.g. intravenous.

For intravenous, injection, or injection at the site of affliction, the active ingredient will be in the form of a parenterally acceptable aqueous solution which is pyrogen-free and has suitable pH, isotonicity and stability. Those of
5 relevant skill in the art are well able to prepare suitable solutions using, for example, isotonic vehicles such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Lactated Ringer's Injection. Preservatives, stabilisers, buffers, antioxidants and/or other additives may be included, as required.

10

A composition may be administered alone or in combination with other treatments, either simultaneously or sequentially dependent upon the condition to be treated. Other treatments may include the administration of suitable doses of pain
15 relief drugs such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (e.g. aspirin, paracetamol, ibuprofen or ketoprofen) or opiates such as morphine, or anti-emetics.

20

The present invention provides a method comprising causing or allowing binding of a specific binding member as provided herein to ED-B. As noted, such binding may take place in vivo, e.g. following administration of a specific binding member, or nucleic acid encoding a specific binding member, or it may take place in vitro, for example in ELISA, Western
5 blotting, immunocytochemistry, immuno-precipitation or affinity chromatography.

0

The amount of binding of specific binding member to ED-B may be determined. Quantitation may be related to the amount of the antigen in a test sample, which may be of diagnostic
interest, which may be of diagnostic interest.

36
62

The reactivities of antibodies on a sample may be determined by any appropriate means. Radioimmunoassay (RIA) is one possibility. Radioactive labelled antigen is mixed with unlabelled antigen (the test sample) and allowed to bind to the antibody. Bound antigen is physically separated from unbound antigen and the amount of radioactive antigen bound to the antibody determined. The more antigen there is in the test sample the less radioactive antigen will bind to the antibody. A competitive binding assay may also be used with non-radioactive antigen, using antigen or an analogue linked to a reporter molecule. The reporter molecule may be a fluorochrome, phosphor or laser dye with spectrally isolated absorption or emission characteristics. Suitable fluorochromes include fluorescein, rhodamine, phycoerythrin and Texas Red. Suitable chromogenic dyes include diaminobenzidine.

Other reporters include macromolecular colloidal particles or particulate material such as latex beads that are coloured, magnetic or paramagnetic, and biologically or chemically active agents that can directly or indirectly cause detectable signals to be visually observed, electronically detected or otherwise recorded. These molecules may be enzymes which catalyse reactions that develop or change colours or cause changes in electrical properties, for example. They may be molecularly excitable, such that electronic transitions between energy states result in characteristic spectral absorptions or emissions. They may include chemical entities used in conjunction with biosensors. Biotin/avidin or biotin/streptavidin and alkaline phosphatase detection systems may be employed.

The signals generated by individual antibody-reporter conjugates may be used to derive quantifiable absolute or relative data of the relevant antibody binding in samples (normal and test).

5

The present invention further extends to a specific binding member which competes for binding to ED-B with any specific binding member which both binds the antigen and comprises a V domain including a CDR with amino acid substantially as set out herein, preferably a VH domain comprising VH CDR3 of SEQ ID NO. 3. Competition between binding members may be assayed easily *in vitro*, for example by tagging a specific reporter molecule to one binding member which can be detected in the presence of other untagged binding member(s), to enable identification of specific binding members which bind the same epitope or an overlapping epitope. Competition may be determined for example using the ELISA as described in Carnemolla et al. (24 1996).

As stated above, methods of producing specific binding members according to the invention may comprise expressing encoding nucleic acid, and may optionally involve culturing host cells under conditions for production of the specific binding member. Specific binding members and encoding nucleic acid molecules and vectors according to or for use in the present invention may be provided isolated and/or purified, e.g. from their natural environment, in substantially pure or homogeneous form, or, in the case of nucleic acid, free or substantially free of nucleic acid or genes origin other than the sequence encoding a polypeptide with the required function.

Nucleic acid used according to the present invention may comprise DNA or RNA and may be wholly or partially synthetic. Reference to a nucleotide sequence as set out herein encompasses a DNA molecule with the specified sequence, and
5 encompasses a RNA molecule with the specified sequence in which U is substituted for T, unless context requires otherwise.

Systems for cloning and expression of a polypeptide in a
.0 variety of different host cells are well known. Suitable host cells include bacteria, mammalian cells, yeast and baculovirus systems. Mammalian cell lines available in the art for expression of a heterologous polypeptide include Chinese hamster ovary cells, HeLa cells, baby hamster kidney cells,
.5 NSO mouse melanoma cells and many others. A common, preferred bacterial host is *E. coli*.

The expression of antibodies and antibody fragments in prokaryotic cells such as *E. coli* is well established in the
0 art. For a review, see for example Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991). Expression in eukaryotic cells in culture is also available to those skilled in the art as an option for production of a specific binding member, see for recent reviews, for example Ref, M.E. (1993) Curr. Opinion
5 Biotech. 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560.

Suitable vectors can be chosen or constructed, containing appropriate regulatory sequences, including promoter
0 sequences, terminator sequences, polyadenylation sequences, enhancer sequences, marker genes and other sequences as appropriate. Vectors may be plasmids, viral e.g. 'phage, or phagemid, as appropriate. For further details see, for

example, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3rd edition, Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Many known techniques and protocols for manipulation of nucleic acid, for example in preparation of nucleic acid
5 constructs, mutagenesis, sequencing, introduction of DNA into cells and gene expression, and analysis of proteins, are described in detail in *Current Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. The disclosures of Sambrook et al. and Ausubel et al. are
10 incorporated herein by reference.

A method of producing a specific binding member according to the invention may further comprise introducing encoding nucleic acid into a host cell. The introduction may employ
15 any available technique. For eukaryotic cells, suitable techniques may include calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran, electroporation, liposome-mediated transfection and transduction using retrovirus or other virus, e.g. vaccinia or, for insect cells, baculovirus. For bacterial cells,
20 suitable techniques may include calcium chloride transformation, electroporation and transfection using bacteriophage.

The introduction may be followed by causing or allowing
5 expression from the nucleic acid, e.g. by culturing host cells under conditions for expression of the gene.

In one embodiment, the nucleic acid of the invention is integrated into the genome (e.g. chromosome) of the host cell.
10 Integration may be promoted by inclusion of sequences which promote recombination with the genome, in accordance with standard techniques.

Further aspects and embodiments of the present invention will be apparent to those skilled in the art in the light of the present disclosure including the following experimental exemplification. Methods for synthesis and labelling of the specific binding members of the present invention are more fully illustrated in the following examples. These examples are shown by way of illustration and not by way of limitation. All documents mentioned anywhere in this specification and incorporated by reference.

EXPERIMENTAL EXEMPLIFICATION OF ASPECTS AND EMBODIMENTS OF THE PRESENT INVENTION

1. Preparation and characterisation of specific binding members according to the present invention

The following examples use radiolabelled peptide compounds L19-SIP.

1.1 Synthesis of I-131-L19-SIP (Chloramine-T Method)

200 µg L19-SIP in 230 µl PBS (0.2 M PBS, pH 7.4) were placed in a reaction vial, mixed with 185 MBq [¹³¹I]NaI, and reacted with 30 µL of a freshly prepared solution of Chloramine-T (2 mg/mL) in 0.2 M PBS (pH 7.4). After 1 min, 50 µL of a solution of Na₂S₂O₅ (10 mg/mL in PBS 0.2 M, pH 7.4). ¹³¹I-labeled L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS), pre-blocked with 5 ml of 0.5 % bovine serum albumin in PBS.

Radiochemical yield: 45.7 %.

Radiochemical purity: 88.3 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 31.7 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 76 %

1.2 Synthesis of I-131-L19-SIP (iodogen method)

800 µg L19-SIP in 800 µl PBS (0.2 M PBS, pH 7.4) and 500 MBq [¹³¹I]NaI were mixed and placed in a reaction vial (iodogen tube, Pierce Inc.). The mixture was shaken gently, over a period of 30 min at room temperature. ¹³¹I-labeled L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS), pre-blocked with 5 ml of 0.5 % bovine serum albumin in PBS.

Radiochemical yield: 93.2 %.

Radiochemical purity: 91.1 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 46.6 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 78 %

1.3 Synthesis of I-123-L19-SIP (iodogen method)

200 µg L19-SIP in 230 µl PBS (0.2 M PBS, pH 7.4) and 200 MBq [¹²³I]NaI were mixed and placed in a reaction vial (iodogen tube, Pierce Inc.). The mixture was shaken gently, over a period of 30 min at room temperature. ¹²³I-labeled L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS), pre-blocked with 5 ml of 0.5 % bovine serum albumin in PBS.

Radiochemical yield: 81.6 %.

Radiochemical purity: 89.6 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 61.2 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 84 %

42
68

1.4 Synthesis of I-124-L19-SIP (iodogen method)

200 µg L19-SIP in 230 µl PBS (0.2 M PBS, pH 7.4) and 50 MBq [¹²³I]NaI were mixed and placed in a reaction vial (iodogen tube, Pierce Inc.). The mixture was shaken gently, over a
5 period of 30 min at room temperature. ¹²⁴I-labeled L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS), pre-blocked with 5 ml of 0.5 % bovine serum albumin in PBS.

10 Radiochemical yield: 84.5 %.

Radiochemical purity: 89.6 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 22.8 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 86 %

15 1.5 Synthesis of (3-(4-hydroxy-3-[¹³¹I]iodo-phenyl)-propionate)-L19-SIP

500 µg (3-(4-hydroxy-phenyl)-N-(sulfonato-succinimidyl) propionate) was dissolved in 1 mL of DMSO. Ten microliters of Chloramine-T (5 mg/ml in PBS) were mixed with 74 MBq [¹³¹I]NaI,
20 neutralized with 15 µL of PBS (0.2 M, pH 7.4). One microliter of the (3-(4-hydroxy-phenyl)-N-(sulfonato-succinimidyl) propionate) solution is added to the Chloramine-T/[¹³¹I]NaI solution and the mixture is allowed to react for 1 min. The reaction is stopped by the addition of 40 µL of a solution of
25 Na₂S₂O₅ (10 mg/mL in PBS 0.2 M, pH 7.4), followed by the immediate addition of 200 µg L19-SIP in 230 µl borate buffer (0.2 M PBS, pH 8.5).

(3-(4-hydroxy-3-[¹³¹I]iodo-phenyl)-propionate)-L19-SIP was
30 purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS), pre-blocked with 5 ml of 0.5 % bovine serum albumin in PBS.

47
69

Radiochemical yield: 37.2 %.

Radiochemical purity: 94.6 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 10.3 MBq/nmol.

5 Immunoreactivity: 69 %

1.6 MIRD calculations of I-131-L19-SIP

Based on biodistribution data in tumor-bearing mice absorbed doses of the I-131 labeled L19-SIP could be calculated by the MIRD formalism. Biokinetic modeling was performed with the ID data of I-131-L19-SIP in human glioblastoma (U251) bearing mice. The residence times were calculated as the areas under the curve of bi- and mono-exponential functions integrated from zero to infinity including the biological and physical half-life of the compound.

Considering the mouse organs as both the radiation source and the radiation target absorbed organ doses as self-to-self doses (no radiation cross fire) could be estimated for I-131-L19-SIP using S-values from the MIRDose 3.1 software.

Mouse organ doses (mGy/ MBq):

Liver	50
Kidneys	160
15 Spleen	50
Lung	220
Ovaries	180-410 (depending on ovulation cycle status and ED-B expression)
Uterus	600 (depending on ovulation cycle status and
0 ED-B expression)	
Testis	55
Blood	130

42
70

Red Marrow 50 (calculation based on the blood dose)
Tumor 940 (calculated for a 100 mg tumor)

Using the calculated residence times in the MIRDose 3.1
5 program human absorbed doses can be estimated for the I-131-
L19-SIP.

Human organ doses (mGy/ MBq):

Adrenals	9.46E-02
Brain	1.64E-02
Breasts	7.33E-02
Gall bladder	1.00E-01
LLI Wall	4.47E-01
Small Intestine	1.10E-01
Stomach	9.45E-02
ULI Wall	2.11E-01
Heart Wall	6.22E-02
Kidneys	1.86E-01
Liver	7.46E-02
Lungs	7.04E-02
Muscle	8.71E-02
Ovaries	8.07E-01
Pancreas	1.15E-01
Red Marrow	9.11E-02
Bone Surface	9.74E-02
Skin	7.20E-02
Spleen	7.11E-02
Testes	2.38E-01
Thymus	8.55E-02
Thyroid	8.54E-02
Urin Bladder Wall	7.19E-01
Uterus	4.72E-01
Total Body	8.78E-02
EFF DOSE EQUIV	3.60E-01
EFF DOSE	3.21E-01

It was concluded that the Red Marrow and the reproductive organs (ovaries/ uterus and testes) would be the dose limiting organs. Nevertheless, the therapeutic window based on the dosimetric calculations looked favorable and promising. A Tumor dose to Red Marrow dose ratio of 18 was found. Thus, I-

283
71

131-L19-SIP displayed a remarkable 18-fold higher dose delivered to the tumor than to the red marrow.

1.7 Tumor treatment study after single i.v. injection of I-131-L19-SIP into tumor bearing nude mice

I-131-L19-SIP was injected once intravenously into U251 (glioblastoma) bearing nude mice (body weight about 27 g). The investigated doses were 37 MBq and 74 MBq, respectively. In addition, a control group of animals (injected once with physiological saline) was investigated. During the days after injection, the tumor size (given in mm²) was determined using a caliper.

The growth of U251 tumors in nude monitored after single intravenous injection of physiological saline and I-131-L19-SIP, respectively, is shown in Figure 6.

A single injection of the I-131-L19-SIP with 74 MBq per animal showed a pronounced effect on the growth of U251-tumors resulting in a stasis for 18 days. The same was true for the low dose group (37 MBq) except a slight tumor growth which was started during the last 5 days for the low dose group. In contrast, tumors of the control group grew continuously during the whole observation period.

The results of this investigation show excellent potential of I-131-L19-SIP for the treatment of solid tumors.

1.8 Imaging of I-123-L19-SIP after single i.v. injection into tumor bearing nude mice

The substance of the invention was injected intravenously in a dose of about 9.25 MBq into F9 (teratocarcinoma) bearing

44
72

nude mice (body weight about 25 g). Gamma-camera imaging was carried out at various times after administration of the substance.

- 5 By planar scintigraphy of I-123-L19-SIP in F9 (teratocarcinoma) bearing nude mice 4 hours after injection and 24 hours after injection, the tumor could be clearly depicted. At 4 hours after injection, besides the strong uptake in the tumor only a slight background in the rest of
10 the body (not bound to a particular organ but derived from the blood pool) could be detected. Whereas the signal in the tumor maintained, the background signal in the rest of the body disappeared over time. Thus, at 24 hours post injection only the tumor could be detected.

.5

The results of this investigation shows the excellent potential of I-123-L19-SIP for the imaging of solid tumors.

2. Further Examples and Experiments

0

MATERIALS AND METHODS .

Preparation and expression of scFv, small immunoprotein (SIP) and IgG1 constructs scFv

- 5 The scFv(L19) (Figure 1A) is an affinity matured ($K_d=5.4 \times 10^{-11} \text{M}$) antibody fragment specifically directed against the ED-B domain of fibronectin (13 Pini et al., 1998). The scFv(D1.3) (7 McCafferty et al.; 26 Neri et al., 1997), a mouse-anti-hen egg white lysozyme scFv, was used as a control. These scFvs
10 were expressed in *E. Coli* strain HB2151 (Maxim Biotech, San Francisco CA) according to Pini et al. (34 1997).

Mini-immunoglobulin

To construct the L19 small immunoprotein (L19-SIP) gene (Figure 1C) the DNA sequence coding for the scFv(L19) was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using Pwo DNA
5 Polymerase (Roche), according to manufacturer's recommendations, with primers BC-618

(gtgtgcactcggaggtgcagctggttgagctctggg - SEQ ID NO. 8) and BC-619 (gcctccggatttgatttcaccttggtcccttggtcc - SEQ ID NO. 9), containing ApaLI and BspEI restriction sites, respectively.

10 The amplification product was inserted ApaLI/BspEI in the pUT- ϵ SIP vector, which provides the scFv gene with a secretion signal, required for secretion of proteins in the extracellular medium. The pUT- ϵ SIP vector was obtained from the previously described pUT-SIP-long (33 Li et al., 1997)
15 after substituting the human constant γ 1-CH3 domain with the CH4 domain of the human IgE secretory isoform IgE-S2 (ϵ_{82} -CH4; 35 Batista et al., 1996). CH4 is the domain that allows dimerization in the IgE molecule and the ϵ_{82} isoform contains a cysteine at the carboxyterminal end, which stabilizes the IgE
20 dimer through an inter-chain disulphide bond. In the final SIP molecule the ScFv(L19) was connected to the ϵ_{82} -CH4 domain by a short GGSG linker. The SIP gene was then excised from the plasmid pUT- ϵ SIP-L19 with HindIII and EcoRI restriction enzymes and cloned into the mammalian expression vector pcDNA3
25 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), which contains the Cytomegalovirus (CMV) promoter, in order to obtain the construct pcDNA3-L19-SIP.

The DNA sequence coding for scFv(D1.3) was amplified using the
10 primers BC-721 (ctcgtgcactcgcaggtgcagctgcaggagtca - SEQ ID NO. 10) and BC-732 (ctctccggaccgtttgatctcgcgcttggt - SEQ ID NO. 11) and inserted ApaLI/BspEI in the pUT- ϵ SIP vector. The D1.3-

46
74

SIP gene was then excised from the pUT- α SIP-D1.3 with HindIII and EcoRI restriction enzymes and cloned into pcDNA3, in order to obtain the construct pcDNA3-D1.3-SIP.

5 These constructs were used to transfect SP2/0 murine myeloma cells (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) using FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), following the protocol for adherent cells, optimized by the manufacturer. Transfectomas were grown in DMEM supplemented
10 with 10% FCS and selected using 750 μ g/ml of Geneticin (G418, Calbiochem, San Diego, CA).

IgG1

To prepare complete IgG1, the variable region of the L19 heavy
15 chain (L19-VH), together with its secretion peptide sequence, was excised with HindIII and XhoI from the previously described L19-pUT α SIP and inserted in the pUC-IgG1 vector, containing the complete human γ 1 constant heavy chain gene. The recombinant IgG1 gene was then excised from the pUC-IgG1-
20 L19-VH with HindIII and EcoRI and cloned into pcDNA3, to obtain the construct pcDNA3-L19-IgG1.

For the preparation of the complete L19 light chain, L19-VL was amplified from the L19-pUT- α SIP (described above) by PCR
5 using the primers BC-696 (tggtgtgcactcggaaattgtgttgacgcagtc - SEQ ID NO. 12) and BC-697 (ctctcgtacgtttgatttccaccttggtcc - SEQ ID NO. 13), containing ApaLI and BsiWI restriction sites, respectively. After digestion with ApaLI and BsiWI, the amplification product was inserted in the vector pUT-SEC-hC κ
0 containing the secretion signal sequence and the sequence of the human constant κ light chain. The recombinant light chain gene was then excised from pUT-SEC-hC κ -L19-VL with HindIII and

47
75

XhoI and inserted in the pCMV2A, mammalian expression vector, derived from a pcDNA3 vector by removing the resistance gene to G418, to obtain the construct pCMV2A-L19-k.

5 Equimolar amounts of these constructs were used to cotransfect SP2/0 murine myeloma cells as described above. Geneticin selected clones were screened in ELISA for the ability to secrete chimeric immunoglobulin, complete of heavy and light chains.

10 All DNA constructs were purified using the Maxiprep system from Qiagen (Hilden, Germany), and the DNA sequences of both strands of the constructs were confirmed using the ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
15 (Perkin Elmer, Foster City, CA). All restriction enzymes (RE) were from Roche Diagnostics (Milan, Italy), with the exception of BsiWI (New England Biolabs, Beverly, MA). After RE digestion, inserts and vectors were recovered from agarose gels using the Qiaquick method (Qiagen).

20 *Purification and quality control of antibodies*

Immunoaffinity chromatography was performed to purify the different antibodies according to the procedure described by Carnemolla et al. (24 1996).

5 ED-B conjugated to Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden) following manufacturer's instructions (24 Carnemolla et al., 96) was used to immunopurify all different L19 antibody formats, while a column of hen egg white lysozyme
0 (Sigma, St.Louis, USA) conjugated to Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) was used for D1.3 antibodies.

28
76

The immunopurified antibody formats L19-SIP and L19-IgG1 required no further purification and were dialyzed against PBS, pH 7.4, at +4°C. Since scFvs obtained from immunoaffinity chromatography are made up of two forms, monomeric and dimeric, a second purification step, as described by Demartis et al. (27 2001), was required to isolate the latter form. Batches of the different antibody formats were prepared and analyzed using SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions, immunohistochemistry, size exclusion chromatography (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) and ELISA experiments.

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), size exclusion chromatography and immunohistochemistry

Screening ELISA experiments on the conditioned culture media were performed according to Carnemolla et al. (24 1996). To reveal the expression of the different L19 antibody formats, the recombinant fragment 7B89 (24 Carnemolla et al., 1996), containing the ED-B domain of FN, that includes the epitope recognized by the L19, was immobilized on Maxisorp immunoplates (Nunc, Roskilde, Denmark). To detect D1.3 antibodies in ELISA experiments, hen egg white chicken lysozyme (Sigma) was immobilized on NH2 surface EIA plates (Costar, Cambridge, MA). A peroxidase-conjugated rabbit anti human IgE (Pierce, Rockford, IL), diluted according to manufacturer's recommendations, was used as secondary antibody to detect SIPs. A peroxidase-conjugated rabbit anti human IgG (Pierce) was used in the case of IgG1. For the scFvs containing the tag sequence FLAG, a mouse anti-human FLAG monoclonal antibody (M2, Kodak) and a peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Pierce) were used as secondary and tertiary antibodies, respectively. In all cases the

49
74

immunoreactivity with the immobilized antigen was detected using the substrate ABTS for peroxidase (Roche) and photometric absorbance at 405 nm was measured.

- 5 A Superdex 200 (Amersham Pharmacia) chromatography column was used to analyze the gel filtration profiles of the purified antibodies under native conditions using fast protein liquid chromatography (FPLC; Amersham Pharmacia). Immunohistochemistry on different tissue cryostat sections was
10 performed as described by Castellani et al. (22 1994) and 4-18% gradient SDS-PAGE was carried out according to Carnemolla et al. (17 1989) under reducing and non-reducing conditions..

Animals and cell lines

- 15 Athymic-nude mice (8 week-old nude/nude CD1 females) were obtained from Harlan Italy (Correzzana, Milano, Italy), 129 (clone SyHsd) strain mice (8-10 weeks old, female) were obtained from Harlan UK (Oxon, England). Mouse embryonal teratocarcinoma cells (F9), human melanoma derived cells (SK-
20 MEL-28) and mouse myeloma cells (SP2/0) were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). To induce tumors, nude mice were subcutaneously injected with 16×10^6 SK-MEL-28 cells, and 129 strain mice with 3×10^6 F9 cells. The tumor volume was determined with the following formula:
25 $(d)^2 \times D \times 0,52$, where d and D are, respectively, the short and long dimensions (cm) of the tumor, measured with a caliper. Housing, treatments and sacrifice of animals were carried out according to national legislation (Italian law no. 116 of 27 January, 1992) regarding the protection of animals used for
30 scientific purposes.

SD
78

Radioiodination of recombinant antibodies

Radioiodination of proteins was achieved following the Chizzonite indirect method (36 Riske et al., 1991) using IODO-GEN Pre-coated Iodination tubes (Pierce) to activate Na¹²⁵I (NEN Life Science Products, Boston, MA) according to manufacturer's recommendations. In the reported experiments, 1.0 mCi of Na¹²⁵I was used for 0.5mg of protein. The radiolabeled molecules were separated from free ¹²⁵I using PD10 (Amersham Pharmacia) columns pre-treated with 0.25% BSA and equilibrated in PBS. The radioactivity of the samples was established using a Crystal γ -counter (Packard Instruments, Milano, Italy). The immunoreactivity assay of the radiolabeled protein was performed on a 200 μ l ED-B Sepharose column saturated with 0.25% BSA in PBS. A known amount of radioiodinated antibody, in 200 μ l of 0.25% BSA in PBS, was applied on top and allowed to enter the column. The column was then rinsed with 1.5 ml of 0.25% BSA in PBS to remove non-specifically bound antibodies. Finally, the immunoreactive bound material was eluted using 1.5 ml of 0.1M TEA, pH11. The radioactivity of unbound and bound material was counted and the percentage of immunoreactive antibodies was calculated. Immunoreactivity was always higher than 90%.

To further analyze the radioiodinated antibodies a known amount of radiolabeled protein in 200 μ l was loaded onto the Superdex 200 column. The retention volume of the different proteins did not vary after radioiodination. For the three radioiodinated L19 antibody formats and their negative controls, the radioactivity recovery from the Superdex 200 column was 100% (Figure 3A, 3B and 3C).

Biodistribution experiments

To block non-specific accumulation of ^{125} Iodine in the stomach and concentration in thyroid, 30 minutes before injection of the radiolabeled antibodies mice orally received 20 mg of sodium perchlorate (Carlo Erba, Italy) in water. This procedure was repeated at 24h intervals for the duration of biodistribution experiments. Tumor-bearing mice were injected in the tail vein with 0,1 nmoles of the different radiolabeled antibodies (corresponding to 6 μ g for scFvs, 8 μ g for SIPs and 18 μ g for IgGs) in 100 μ l of saline. Three animals were sacrificed per time point, the different organs including tumor were excised, weighed, counted in a γ -counter and then fixed with 5% formaldehyde in PBS, pH 7.4, to be processed for microautoradiographies, performed according to Tarli et al. (23 1999).

The blood was sampled also for plasma preparation to determine the stability of the radiolabeled molecules in the blood stream using the already described immunoreactivity test and the gel filtration analysis. In both cases 200 μ l of plasma were used. The radioactive content of the different organs was expressed as percentage of injected dose per gram (%ID/g). The blood clearance parameters of the radioiodinated antibodies was fitted with a least squares minimization procedure, using the MacIntosh Program Kaleidagraph (Synergy Software, Reading PA, USA) and the equation:

$$X(t) = A \exp(-(\alpha t)) + B \exp(-(\beta t))$$

where $X(t)$ is the %ID/g of radiolabeled antibody at time t . This equation describes a bi-exponential blood clearance profile, in which the amplitude of the alpha phase is defined as $A \times 100 / (A + B)$ and the amplitude of the beta elimination phase is defined as $B \times 100 / (A + B)$. Alpha and beta are rate

parameters related to the half-lives of the corresponding blood clearance phases. $T_{1/2}$ (alpha phase) = $\ln 2 / \alpha = 0.692... / \alpha$ $T_{1/2}$ (beta phase) = $\ln 2 / \alpha = 0.692... / \alpha$. $X(0)$ was assumed to be equal to 40%, corresponding to a blood volume of 2.5 ml in each mouse.

RESULTS

Antibody preparation

- Using the variable regions of L19 (13 Pini et al., 1998) different antibody formats (scFv, mini-immunoglobulin and complete human IgG1) and their performance in vivo in targeting tumoral vasculature.
- Figure 1 shows the constructs used to express the different, L19 antibody formats. Similar constructs were prepared using the variable regions of the scFv specific for a non-relevant antigen (D1.3; 7 McCafferty; 26 Neri et al., 1997).
- To obtain SIPs and IgG1, SP2/0 murine myeloma cells were transfected with the constructs shown in Figure 1 and stable transfectomas were selected using G418. The best producers were determined by ELISA and these clones were expanded for antibody purification. The purification of all three L19 antibody formats was based on immunoaffinity chromatography using recombinant ED-B conjugated to Sepharose. The yields were of about 8 mg/l for scFv(L19), 10mg/l for L19-SIP, 3 mg/l for L19-IgG1. For the control proteins were used scFv(D1.3) specific for hen-egg lysozyme, and, using the variable regions of scFv D1.3, D1.3-SIP was constructed. These two antibodies were purified on hen-egg lysozyme conjugated to Sepharose. The

81

yields were of 8 and 5 mg/l, respectively. As control for L19-IgG1 we used commercially available human IgG1/x (Sigma).

SDS-PAGE analysis of the three purified L19 formats was performed, under both reducing and non-reducing conditions. For scFv(L19), the apparent mass was, as expected, about 28 kDa under both reducing and non-reducing conditions (not shown). The L19-SIP showed a molecular mass of nearly 80 kDa under non-reducing conditions, and had a mass of about 40 kDa under reducing conditions. The results demonstrated that more than 95% of the native molecule exists as a covalently-linked dimer. L19-IgG1 showed, as expected, a main band of about 180 kDa under non-reducing conditions, while, under reducing conditions, it showed two bands corresponding to the heavy chain of about 55 kDa and the light chain of about 28 kDa. Elution profiles of the three L19 antibody formats analyzed by size exclusion chromatography (Superdex 200) were obtained. In all three cases a single peak with a normal distribution, and representing more than 98%, was detected. Using a standard calibration curve, the apparent molecular masses were 60 kDa for scFv(L19)₂, 80kDa for L19-SIP and 180kDa for L19-IgG1. In addition, molecular aggregates that are often present in recombinant protein preparations and that may invalidate the results obtained in in vivo studies were demonstrated to be absent. SDS-PAGE and size exclusion chromatography (Superdex 200) performed on the purified control proteins gave similar results.

Using these three different L19 antibody formats, immunohistochemical analyses were performed on cryostat sections of SK-MEL-28 human melanoma induced in nude mice, and of F9 murine teratocarcinoma induced in 129 strain mice. Optimal results were obtained at concentrations as low as

0.25-0.5 nM. All three purified L19 antibodies recognized identical structures.

In vivo stability of the radiolabeled L19 antibody formats

5 For *in vivo* biodistribution studies, SK-MEL-28 human melanoma and F9 murine teratocarcinoma were used. SK-MEL-28 tumor has a relatively slow growth rate while, F9 tumor grows rapidly (Figure 2). Therefore, the use of SK-MEL-28 tumor enabled long-lasting experiments (up to 144h), while F9 tumor was
10 induced for short biodistribution studies (up to 48h). All the biodistribution experiments were performed when the tumors were approximately 0.1-0.3 cm³. For comparison of the various antibody formats, equimolar amounts (0.1 nmol) in 100µl of sterile saline were injected. Before injection, the
.5 radioiodinated compounds were filtered 0.22 µm and the immunoreactivity and gel filtration profile were checked (see Materials and Methods). Immunoreactivity of the radiolabeled proteins was always more than 90%.

0 Figure 3 A-C reports the profiles of the gel filtration analysis (Superdex 200) of the radioiodinated L19 antibody formats.

Blood samples were taken from treated animals at the different
; time intervals from injection and the radioactivity present in plasma was analyzed for immunoreactivity and by gel filtration chromatography. Gel filtration profiles showed a single major peak, having the molecular mass of the injected protein, for all three L19 antibody formats. Only the profile of the scFv revealed a second peak having a higher molecular mass, suggesting formation of aggregates (Figure 3 D-F). Furthermore, the formation of large molecular mass aggregates not eluting from the Superdex 200 column, was observed for

83

scFv(L19)2. In fact, while the recovery from the Superdex 200 column was 90-100% of the applied radioactivity for both L19-SIP and L19-IgG, the yield of the loaded radioactivity of scFv(L19)2 was about 55%. The retained radioactivity was recovered only after washing the chromatography column with 0.5M NaOH, demonstrating that large aggregates were blocked on the column filter (Table 1).

Table 1 also reports the results of the immunoreactivity test performed on plasma (see Materials and Methods). Over the time of the experiments, L19-SIP and L19-IgG1 maintained the same immunoreactivity in plasma as the starting reagents. On the contrary, already 3 hours after injection the immunoreactivity of scFv(L19)2 in plasma was reduced to less than 40%.

Comparative biodistribution experiments

Tables 2 a, b, c and Figure 4 report the results obtained in the biodistribution experiments with the radiolabeled L19 antibodies in SK-MEL-28 tumor bearing mice.

Tables 2 a,b,c show, at different times from i.v. injection of the radiolabeled antibodies, the average ($\pm$ SD) of the %ID/g of tissues and organs, including tumors.

In Figure 4 are depicted the variations of the %ID/g of the different antibody formats in tumor (A) and blood (B) at the different times of the experiments, as well as the ratios (C) between the %ID/g in tumor and blood. All three L19 antibody formats selectively accumulated in the tumor and the ratio of the %ID/g of tumor and other organs are reported in Table 3.

As demonstrated by microautoradiography, the antibodies accumulate only on the tumor vasculature, whereas no specific accumulation on the vasculature of normal organs was seen. By contrast, no specific accumulation of the radioiodinated control molecules in either tumors or normal tissues was found (Tables 2 a, b, c).

All three L19 antibody formats showed a clearance that was mediated mainly by the kidney, as determined by counting the urine samples. As expected, clearance rate was faster for scFv(L19)2 and slower for the complete L19-IgG1. Fitting of the curve with a biexponential function yielded the half-live values reported in Table 4.

Figure 5 depicts the variations in the %ID/g ($\pm$ SD) of tumor and blood obtained with the radioiodinated scFv(L19)2 and L19-SIP using the F9 teratocarcinoma tumor model. Due to the high angiogenic activity of F9 teratocarcinoma, accumulation of radioactive molecules in this tumor was 3 to 4 times higher, 3 and 6 h after i.v. injection than in SK-MEL-28 tumor and was persistently higher for the 48h duration of the experiment. As for SK-MEL-28 tumor, specific accumulation in tumor vasculature was confirmed by microautoradiography, while no specific tumor accumulation was seen after injection of the control molecules. In Table 5 are reported the %ID/g of L19(scFv) and L19SIP, at different times after i.v. injection, in F9 tumors and other organs.

Synthesis of reduced L19-SIP

To a solution of 375 μ g (5nmol) L19-SIP in 422 μ l PBS were added 50 μ l TCEP-solution (14.34mg TCEP $\times$ HCl/5ml aqueous Na₂HPO₄, 0.1M, pH = 7.4). The reaction mixture was gently shaken for 1h at 37°C. Reduced L19-SIP was purified by gel-chromatography using

57
85

a NAP-5 column (Amersham, Eluant: PBS). SDS-PAGE analysis of the isolated product proofed the quantitative transformation of L19-SIP to reduced L19-SIP.

5 Yield: 100.3µg/200µl PBS (26.7%).

Synthesis of Tc-99m-L19-SIP

3.0 mg disodium-L-tartrate were placed in a vial followed by addition of 100.3µg reduced L19-SIP in 200µl PBS and the
10 solution was diluted with 100µl aqueous Na₂HPO₄-buffer (1M, pH = 10.5). 85µl Tc-99m generator eluate (24h) and 10µl SnCl₂-solution (5mg SnCl₂/1ml 0.1M HCl) were added. The reaction mixture was shaken for 0.5h at 37°C. Tc-99m-labeled L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column
15 (Amersham, Eluant: PBS).

Radiochemical yield: 35.6%.

Radiochemical purity: 90.2% (SDS-PAGE).

20

Specific activity: 26.4MBq/nmol.

Immunoreactivity: 91.4%

5 *Synthesis of Tc-99m-MAG₂-L19-SIP Carboxy methyl-t-butyl disulfide*

A solution of 21.75ml (0.312mol) 1-mercapto-acetic acid, 43.5ml (0.312mol) triethylamine and 100g (0.312mol) N-(tert.-butylthio)-N,N'-di-BOC-hydrazine in 1l EtOH (abs.) was heated
0 under reflux (N₂-atmosphere) for 60h. EtOH was evaporated under reduced pressure to a final volume of about 200ml. The residue was poured in 1.8l H₂O and the pH of the resulting suspension

was adjusted to 7.14 using 5molar NaOH. Di-BOC-hydrazine was filtered off and the pH of the resulting solution was adjusted to 2.2 using half-concentrated HCl. Crude material was extracted from water 3x with 600 ml CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure yielding 41.1g (80%) as a yellow oil. The material was pure enough for further synthesis.

N-(benzyloxycarbonyl-Gly)Gly t-butyl ester (*Z*-(*N*-Gly)Gly t-butyl ester

A solution of 35.02g (114mmol) *Z*-Gly-OSuccinimide and 15g (114mmol) Gly-O-^tBu in 1.4l CH₂Cl₂ was stirred under N₂-atmosphere at room temperature for 20 h. The organic layer was washed 3x with 250ml 1% aqueous citric acid, 2x with 200ml half-saturated aqueous NaHCO₃ and 1x with 200ml water. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄. Evaporation of CH₂Cl₂ under reduced pressure yielded 36.5 g (99%) *Z*-Gly-Gly-O-^tBu as a yellow oil. The crude material was pure enough for further synthesis.

Gly-Gly t-butyl ester

36.5 g (113 mmol) of *Z*-Gly-Gly-O^tBu were dissolved in 1l THF followed by the addition of 3.65 g palladium on charcoal (10%). The mixture was stirred under H₂ atmosphere (1atm) for 3h at room temperature. The suspension was purged with N₂, filtered (PTFE-filter: 0.45µm) and the filtrate was concentrated under reduced pressure yielding 20.3g (95%) Gly-Gly-O-^tBu as a yellow oil. The crude material was pure enough for further synthesis.

Carboxy methyl-t-butyl disulfide glycyl glycine t-butylester

A solution of 23.85g (115.6mmol) DCC in 430ml CH₂Cl₂ was dropwise added to a solution of 21.76 g (115.6 mmol) Gly-Gly-

59
87

O-^tBu, 20.84 g (115.6 mmol) Carboxy methyl-*t*-butyl disulfide and 13.3 g (115.6 mmol) NHS in 1 l CH₂Cl₂. The resulting suspension was stirred over night under N₂-atmosphere at room temperature. After filtration the resulting solution was
5 washed 3x with 400ml half-saturated aqueous NaHCO₃ and 1x with 400 ml water. The dried organic layer (MgSO₄) was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel using a solvent gradient ranging from CH₂Cl₂/MeOH 99:1 to CH₂Cl₂/MeOH 98.5:1.5. 26.1g (64 %) were
10 isolated as a yellow oil.

Mercaptoacetyl glycyl glycine

26.32g (75.09mmol) Carboxy methyl-*t*-butyl disulfide glycyl glycine *t*-butyl ester were dissolved in 233ml TFA under N₂-
15 atmosphere. The resulting solution was stirred for 20min at room temperature. TFA was evaporated under reduced pressure (5-10 x 10⁻²mbar) and the resulting oil was dried under stirring for additional 2h (5-10 x 10⁻²mbar). After addition of 250ml Et₂O a white powder precipitated and the suspension was
20 stirred for 3h. The material was filtered off and resuspended in 100ml Et₂O. The resulting suspension was stirred over night, the product was filtered off and the material was dried at room temperature under reduced pressure yielding 20.46g (92.5%) as a white powder.

25

Mercaptoacetyl glycyl glycine NHS ester

Mercaptoacetyl glycyl glycine (1g, 3.4 mmol) and N-hydroxysuccinimide (391 mg, 3.4 mmol) are combined in a dry round bottom flask and dissolved in anhydrous DMF (4 ml). DCC
30 (700 mg, 3.4 mmol) in anhydrous dioxane (2 ml) was added while stirring the reaction mixture. Within 15 min a precipitate (DCU) begins to form. After 1 h the precipitate is removed by vacuum filtration. The precipitate was washed with cold

88

dioxane. The dioxane was removed from the filtrate. The product was precipitated from the remaining DMF solution by adding diethylether. The product was isolated by filtration, washed with cold diethylether, and dried in a vacuum desiccator overnight. Yield: 1.33 (99 %).

Synthesis of Tc-99m-MAG₂-s-HN(Lys)-L19-SIP

200 µg (2.66 nmol) non-reduced L19-SIP in 111 µl PBS were diluted with 300 µl of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) and dialyzed 2 x 1 h with 200ml of phosphate buffer (0.1M, pH 8.5) employing a Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.). 50 µl of mercaptoacetyl glycyl glycine NHS ester solution (0.50 mg dissolved in 500 µl of phosphate buffer, 0.1M, pH 8.5) were added and the reaction mixture was heated for 3 h at 37°C. The reaction mixture was dialyzed 2 x 1 h and 1 x 17 h (over night) with 200 ml of phosphate buffer (0.1M, pH 8.5) each, employing the Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.). 3.0 mg disodium-L-tartrate were added to the vial followed by addition of. 90 µl Tc-99m generator eluate (eluted daily) and 25µl SnCl₂-solution (5mg SnCl₂/1ml 0.1M HCl) were added. The reaction mixture was shaken for 0.5h at 37°C. Tc-99m-labeled L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS).

Radiochemical yield: 55.1 %.

Radiochemical purity: 94.5 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 15.2 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 81.1 %

Synthesis of Re-188-L19-SIP

3.0 mg disodium-L-tartrate were placed in a vial followed by addition of 150µg reduced L19-SIP-SH in 310µl PBS and the solution was diluted with 100µl aqueous Na₂HPO₄-buffer (1M, pH = 10.5). 100µl Re-188 generator eluate and 50µl SnCl₂-solution (5mg SnCl₂/1ml 0.1M HCl) were added. The reaction mixture was

89

shaken for 1.5h at 37°C. Re-188-labeled L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS).

5 Radiochemical yield: 34.8 %.

Radiochemical purity: 97.2 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 13.5 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 91.7 %

10 *Synthesis of reduced L19-SIP for specific conjugation of EDTA, CDTA, TETA, DTPA, TTHA, HBED, DOTA, NOTA, DO3A, and a like type chelators to the Cysteine-SH group*

50µl TCEP-solution (14.34mg TCEP·HCl/5ml aqueous Na₂HPO₄, 0.1M, pH = 7.4) were added to a solution of 375µg (5 nmol) L19-SIP

15 in 422µl PBS. The reaction mixture was gently shaken for 1h at 37°C. Reduced L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: sodium acetate buffer, 0.1M, pH 5.0). SDS-PAGE analysis of the isolated product proofed the quantitative transformation of L19-SIP into reduced L19-SIP.

0 Yield: 105.7µg/200µl (28.2%).

Synthesis of In-111-MX-DTPA-Maleimide-S(Cys)-L19-SIP-R

(R = reduced)

105 µg (2.8 nmol) reduced L19-SIP in 200 µl of sodium acetate
5 buffer (0.1M, pH 5) were reacted with 50µl of dissolved

1,4,7-triaza-2-(N-maleimido ethylene p-amino)benzyl-1,7-bis(carboxymethyl)-4-carboxymethyl 6-methyl heptane (0,25mg DTPA-Maleimide in 500µl sodium acetate buffer 0.1M pH 5) for 3 h at 37°C. The reaction mixture was dialyzed 2 x 1 h with

1 200ml of sodium acetate buffer (0.1M, pH 6) employing a Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

62
90

80 µl [In-111]InCl₃ solution (HCl, 1N, 40 MBq, Amersham Inc.) were added and the reaction mixture was heated at 37°C for 30 min.

- 5 In-111 labeled DTPA-Maleimide-S(Cys)-L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS).

Radiochemical yield: 51.6 %.

- 10 Radiochemical purity: 97.2 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 7.9 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 88.5 %

- 15 *Synthesis of MX-DTPA-Maleimide (1,4,7-triaza-2-(N-maleimido ethylene p-amino)benzyl-1,7-bis(carboxymethyl)-4-carboxymethyl 6-methyl heptane)*

- 512 mg (1 mmol) of {[3-(4-Amino-phenyl)-2-(bis-carboxymethyl-amino)-propyl]-[2-(bis-carboxymethyl-amino)-propyl]-amino}-acetic acid (Macrocyclics Inc. Dallas, TX, U.S.A.) and 707 mg
20 (7 mmol) triethylamine were dissolved in 3 ml dry DMF. 400 mg (1,5 mmol) of 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-propionic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester (Aldrich) in 1 ml dry DMF were added drop-wisely. The solution was stirred for 5 h at 50° C. 30 ml of diethylether were added slowly. The reaction
25 mixture was stirred for further 30 min. The precipitate was collected by filtering. The crude product was purified by RP-HPLC (acetonitrile- : water- : trifluoroacetic acid / 3 : 96,9 : 0,1 → 99,9 : 0 : 0,1). Yield: 61% (405 mg, 0,61 mmol). MS-ESI: 664 = M⁺ +1.

91

Synthesis of In-111-MX-DTPA- ϵ -HN(Lys)-L19-SIP

200 μ g (2.66 nmol) non-reduced L19-SIP in 111 μ l PBS were diluted with 300 μ l of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) and dialyzed 2 x 1 h with 200ml of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) employing a Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.). 50 μ l of 1,4,7-triaza-2-(p-isothiocyanato)benzyl-1,7-bis(carboxymethyl)-4-carboxymethyl-6-methyl heptane (MX-DTPA) solution (0.33 mg MX-DTPA dissolved in 500 μ l of sodium borate buffer, 0.1M, pH 8.5) were added and the reaction mixture was heated for 3 h at 37°C. The reaction mixture was dialyzed 2 x 1 h and 1 x 17 h (over night) with 200 ml of sodium acetate buffer (0.1M, pH 6.0) each, employing the Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

80 μ l [In-111]InCl₃ solution (HCl, 1N, 40 MBq, Amersham Inc.) were added and the reaction mixture was heated at 37°C for 30 min. In-111 labeled MX-DTPA- ϵ -HN(Lys)-L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS).

Radiochemical yield: 72.4 %.

Radiochemical purity: 80.3 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 8.8 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 77.5 %

Synthesis of In-111 -DOTA-C-Benzyl-p-NCS - ϵ -HN(Lys)-L19-SIP

200 μ g (2.66 nmol) non-reduced L19-SIP in 108 μ l PBS were diluted with 300 μ l of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) and dialyzed 2 x 1 h with 200ml of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) employing a Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.). 50 μ l of 1,4,7,10-tetraaza-2-(p-

isothiocyanato)benzyl cyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (benzyl-p-SCN-DOTA, Macrocyclics Inc., Dallas TX, U.S.A.) solution (1.5 mg benzyl-p-SCN-DOTA dissolved in 5 ml of sodium borate buffer, 0.1M, pH 8.5) were added to the solution and
5 the reaction mixture was heated for 3 h at 37°C. The reaction mixture was dialyzed 2 x 1 h and 1 x 17 h (over night) with 200 ml of sodium acetate buffer (0.1M, pH 6.0) each, employing the Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

10

80 µl [In-111]InCl₃ solution (HCl, 1N, 40 MBq, Amersham Inc.) were added and the reaction mixture was heated at 37°C for 30 min. In-111 labeled DOTA-C-Benzyl-p-NCS-s-HN(Lys)-L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham,
15 Eluent: PBS).

Radiochemical yield: 70.8 %.

Radiochemical purity: 92.1 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 10.1 MBq/nmol.

20 Immunoreactivity: 75.1 %

Synthesis of Y-88-MX-DTPA-s-HN(Lys)-L19-SIP

200 µg (2.66 nmol) non-reduced L19-SIP in 110 µl PBS were
15 diluted with 300 µl of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) and dialyzed 2 x 1 h with 200ml of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) employing a Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.). 50 µl of MX-DTPA solution (0.33 mg MX-DTPA dissolved in 500 µl of sodium borate buffer, 0.1M, pH
0 8.5) were added and the reaction mixture was heated for 3 h at 37°C. The reaction mixture was dialyzed 2 x 1 h and 1 x 17 h (over night) with 200 ml of sodium acetate buffer (0.1M, pH

6.0) each, employing the Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

100 µl [Y-88]YCl₃ solution (HCl, 1N, 75 MBq, Oak Ridge National Lab.) were added and the reaction mixture was heated at 37°C for 30 min. Y-88 labeled MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS).

10 Radiochemical yield: 68.1 %.

Radiochemical purity: 91.5 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 11.4 MBq/nmol.

Immunoreactivity: 70.5%

15 *Synthesis of Lu-177 -DOTA-C-Benzyl-p-NCS -ε-HN(Lys)-L19-SIP*

200 µg (2.66 nmol) non-reduced L19-SIP in 120 µl PBS were dissolved with 300 µl of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) and dialyzed 2 x 1 h with 200ml of sodium borate buffer (0.1M, pH 8.5) employing a Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.). 50 µl of benzyl-p-SCN-DOTA solution (1.5 mg dissolved in 5 ml of sodium borate buffer, 0.1M, pH 8.5) were added and the reaction mixture was heated for 3 h at 37°C. The reaction mixture was dialyzed 2 x 1 h and 1 x 17 h (over night) with 200 ml of sodium acetate buffer (0.1M, pH

25 6.0) each, employing the Slide-A-Lyzer 10,000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, U.S.A.).

200 µl [Lu-177]LuCl₃ solution (HCl, 1N, 80 MBq, NRH-Petten, Netherlands) were added and the reaction mixture was heated at 37°C for 30 min. Lu-177 labeled DOTA-C-Benzyl-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP was purified by gel-chromatography using a NAP-5 column (Amersham, Eluent: PBS).

78
94

Radiochemical yield: 72.2 %.

Radiochemical purity: 94.9 % (SDS-PAGE).

Specific activity: 18.3 MBq/nmol.

5 Immunoreactivity: 73.4 %

*Organ distribution and excretion of In-111-MX-DTPA-L19-SIP
after a single i.v. injection into tumor-bearing nude mice*

The labeled peptides of the invention were injected
10 intravenously in a dose of about 37 kBq into F9
(teratocarcinoma)-bearing animals (body weight about 25 g).
The radioactivity concentration in various organs, and the
radioactivity in the excreta, was measured using a γ counter
at various times after administration of the substance.

5 The biodistribution of In-111-MX-DTPA-L19-SIP in F9
(teratocarcinoma)-bearing nude mice (mean $\pm$ SD, n=3) is shown
in Table 6.

*Organ distribution and excretion of Tc-99m-L19-SIP after a
single i.v. injection into tumor-bearing nude mice*

Labeled peptides were injected intravenously in a dose of about
56 kBq into F9 (teratocarcinoma)-bearing animals (bodyweight
about 25 g). The radioactivity concentration in various organs,
and the radioactivity in the excreta was measured using a γ
counter at various times after administration of the substance.
In addition, the tumor to blood ratio was found at various times
on the basis of the concentration of the peptide in tumor and
blood.

67
95

The biodistribution of Tc-99m-L19-SIP in F9 (teratocarcinoma)-bearing nude mice (mean $\pm$ SD, n=3) is shown in Table 7.

The tumor to blood ratio of Tc-99m-L19-SIP in F9
5 (teratocarcinoma)-bearing nude mice (mean $\pm$ SD, n=3) is shown in Table 8.

Radiolabeled peptides proved to possess favorable properties in animal experiments. For example, Tc-99m-L19-SIP and In-111-MX-DTPA-s-HN(Lys)-L19-SIP displayed high tumor accumulation of
10 17.2 (Tc-99m) or 12.9 (In-111) % injected dose per gram (ID/g) at 1 hour post injection (p.i.). Significant tumor retention of 9.4 (Tc-99m) or 13.0 (In-111) % ID/g at 24 hours p.i. was observed. Thus, tumor uptake is significantly higher compared to
15 other known In-111 or Tc-99m labeled antibody fragments (e.g. Kobayashi et al., J. Nuc. Med., Vol. 41(4), pp. 755 - 762, 2000; Verhaar et al., J. Nuc. Med., Vol. 37(5), pp. 868 - 872, 1996). The compound's blood clearance lead to tumor/blood ratios of 13:1 and 6:1 respectively, at 24 h p.i.

20

Most remarkably In-111-MX-DTPA-s-HN(Lys)-L19-SIP displayed significantly lower kidney uptake and retention (22.5 % ID/g) than other highly retained In-111 labeled recombinant antibody fragment (120 % ID/g) described e.g. by Kobayashi et al. at 24 h
5 p.i. Kidney retention is a very common problem and usually hampers the use of lanthanide labeled compounds in radiotherapy.

The experimental results demonstrate the excellent potential of the radioimmunoconjugates described herein for diagnostic
0 and therapeutic applications, preferably applied to the patient by parenteral administration.

DISCUSSION

The observation that cytotoxic anticancer drugs localize more efficiently in normal tissues than in tumors (37 Bosslet et al., 1998) prompted a wave of studies investigating the possibility of selective drug delivery to tumors. The effective targeting of tumors, however, has two main requisites: 1) a target in the tumor that is specific, abundant, stable and readily available for ligand molecules coming from the bloodstream, and 2) a ligand molecule with suitable pharmacokinetic properties that is easily diffusible from the bloodstream to the tumor and with a high affinity for the target to ensure its efficient and selective accumulation in the tumor.

Due to its distinctive features the tumor microenvironment is a possible pan-tumoral target. In fact, tumor progression induces (and subsequently needs) significant modifications in tumor micro-environment components, particularly those of the extracellular matrix (ECM). The molecules making up the ECM of solid tumors differ both quantitatively and qualitatively from those of the normal ECM. Moreover, many of these tumor ECM components are shared by all solid tumors, accounting for general properties and functions such as cell invasion (both normal cells into tumor tissues and cancer cells into normal tissues) and angiogenesis. Of the numerous molecules constituting the modified tumor ECM, the present inventors have focused attention on a FN isoform containing the ED-B domain (B-FN).

B-FN is widely expressed in the ECM of all solid tumors thus far tested and is constantly associated with angiogenic processes (22 Castellani et al., 1994), but is otherwise

69
97

undetectable in normal adult tissues (17 Carnemolla et al., 1989). Targeted delivery of therapeutic agents to the subendothelial ECM overcomes problems associated with interstitial hypertension of solid tumors (38 Jain et al. 5 1988; 39 Jain, 1997; 40 Jain RK, 1999).

L19 (13 Pini et al. 1998; 25 Viti, Canc.Res., 23 Tarli, et al., 1999), an scFv with a high affinity ($K_d=5.4 \times 10^{-11} M$) for the ED-B domain of FN, selectively and efficiently accumulates 10 in vivo around tumor neo-vasculature and is able to selectively transport and concentrate in the tumor mass any one of a number of therapeutic molecules to which it is conjugated (28 Birchler et al., 1999; 29 Nilsson, et al., 2001; 30 Halin et al. 2002; 31 Carnemolla et al., 2002). The 15 ability of L19 to selectively target tumors has also been demonstrated in patients using scintigraphic techniques.

The present specification reports on labelling of small immunoprotein (SIP) with radioisotopes, use of the 20 radiolabelled SIP, and on tumor vascular targeting performance and pharmacokinetics of three different L19 human antibody formats: the scFv, the mini-immunoglobulin/small immunoprotein and complete human IgG1.

25 The SIP molecule was obtained by fusion of the scFv(L19) to the ϵ CH4 domain of the secretory isoform S_2 of human IgE. The ϵ CH4 is the domain that allows dimerization of IgE molecules and the S_2 isoform contains a cysteine at the COOH terminal that covalently stabilizes the dimer through an interchain 30 disulphide bond (35 Batista et al., 1996). The IgE binding sites for Fc ϵ RI reside in the CH3 domain (41 Turner and Kinet, 1999; 42 Vangelista et al., 1999; 43 Garman et al., 2000), so scFv fused to ϵ CH4 domain in accordance with embodiments of

70
98

the present invention does not activate any signalling leading to hypersensitivity reactions.

The performance of these three formats in two different tumor models in mouse has been studied: in murine F9 teratocarcinoma and human SK-MEL-28 melanoma. The first is a rapidly growing tumor that, once implanted, kills the animals in about two weeks. SK-MEL-28 tumor, on the other hand, presents a biphasic growth curve, with an early, fast, growth phase followed by a second, slower, phase. It has previously been shown that the amount of ED-B in F9 teratocarcinoma remains stable during tumor growth (23 Tarli, et al., 1999); by contrast, ED-B accumulates in SK-MEL-28 melanoma proportionally to the ability of the tumor to grow (23 Tarli et al., 1999), with abundant ED-B being found in the first phase and a lesser amount in the second. The use of SK-MEL-28 melanoma tumor allowed long-term biodistribution studies without dramatic variations of tumoral mass (Figure 2) that could give rise to misinterpretation of results.

Comparative studies of the three L19 antibody formats in terms of stability *in vivo* showed that L19-SIP and L19-IgG1 maintained, for the duration of experiments (144h), the same immunoreactivity and molecular mass in plasma as before injection. By contrast, scFv(L19) rapidly lost its immunoreactivity in plasma and generated aggregates that were too large to enter the gel filtration chromatography column. Such aggregation of the scFv is very likely responsible for the ratio between %ID/g of tumor and lung, since aggregates could accumulate in the microvasculature of the lung (Table 3). For all three formats, the blood clearance is mediated mainly via the kidney, showing a biphasic curve with an α and

a β phase, reported in Table 4, which is inversely proportional to molecular size.

The accumulation of the different antibody formats in the tumors studied was a consequence of the clearance rate and *in vivo* stability of the molecules. Using the scFv, the maximum percent injected dose per gram (%ID/g) was observed 3h after injection of the radiolabeled antibody and then rapidly decreased. Using the SIP, the %ID/g in tumors was 2-5 times higher than that of the scFv, reaching a maximum 4-6 hours after injection. This pattern was observed in both F9 and SK-MEL-28 tumors. By contrast, the accumulation of IgG1 in tumors rose constantly during the experiments. However, due to its slow clearance, the tumor-blood ratio of the %ID/g after 144 hours was only about 3, compared to a ratio of 10 for the scFv and 70 for the SIP after the same period of time (Figure 4).

The same distinctive properties of *in vivo* stability, clearance and tumor targeting performance shown by the three antibody formats studied here may be exploited for different diagnostic and/or therapeutic purposes, depending on the clinical needs and disease. For instance, radiolabeled antibodies showing good tumor-organ and tumor-blood ratios soon after injection are necessary for *in vivo* diagnostic immunoscintigraphy, mainly because short half-life isotopes are used in such analysis.

Different approaches are possible using antibody as a vehicle for therapeutic agents: delivery of substances that display their therapeutic effects after reaching their targets (e.g., photosensitisers activated only on the targets), for which the absolute amount delivered to the tumor is relevant; delivery of substances that exert their therapeutic and toxic effects

even before reaching the target (e.g., the β -emitter Yttrium-90), for which particular attention must be given to the ratio of the area under the curves of tumor and blood accumulation as a function of time, in order to minimize the systemic toxicity and to maximize the anti-tumor therapeutic effect.

L19-SIP, for instance, seems to offer the best compromise of molecular stability, clearance rate and tumor accumulation. Similar fusion proteins composed of scFv antibody fragments bound to a dimerizing domain have already been described (44 Hu et al, 1996; 33 Li et al., 1997), but in both cases the human $\gamma 1CH3$ was used as the dimerizing domain. The usage of the human $\epsilon_{S2}CH4$ domain provides an easy way of getting a covalent stabilization of the dimer. In addition, the disulphide bridge formed by the C-terminal cysteine residues can be easily reduced in mild enough conditions to preserve the overall structure of the molecule, thus providing a readily accessible reactive group for radiolabelling or chemical conjugation. This feature seems particularly promising in the view of the clinical potential.

L19-IgG1 gathers abundantly in tumors, and even though this accumulation is offset by a slow blood clearance rate, the three step procedure to remove circulating antibodies may be used to allow its use not only for therapeutic purposes but also for diagnostic immunoscintigraphy (45 Magnani et al. 2000).

REFERENCES

1. Shawler et al. J.Immunol., 135: 1530-1535, 1985
2. Miller et al. Blood, 62: 988-995, 1983.
3. Hakimi et al. J.Immunol., 147: 1352-1359, 1991.

4. Stephens et al. *Immunology*, 85: 668-674, 1995.
5. Riechmann et al. *Nature*, 332: 323-327, 1988.
6. Junghans et al. *Cancer Res.*, 50: 1495-1502, 1990.
7. McCafferty et al. *Nature*, 348: 552-554, 1990.
- 5 8. Lowman et al. *Biochemistry*, 30: 10832-10838, 1991
9. Nilsson et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43: 165-196, 2000.
10. Winter et al. *Annu.Rev.Immunol.*, 12: 433-455, 1994.
11. Reichert. *Nature Biotech.*, 19: 819-822, 2001.
- 10 12. Huls et al. *Nature Biotech.*, 17: 276-281, 1999,
13. Pini et al. *J Biol Chem*, 273: 21769-21776, 1998.
14. Neri and Zardi. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31: 43-52, 1998.
15. Bissel and Radisky. *Nature Reviews - Cancer.*, 1: 46-54, 2001
- 15 16. Balza et al. *FEBS Lett.*, 228: 42-44, 1988
17. Carnemolla et al. *J. Cell. Biol.*, 108: 1139-1148, 1989
18. Borsi et al. *FEBS Lett.*, 261: 175-178, 1990
19. Borsi et al. *J. Biol.Chem.*, 270: 6243-6245, 1995.
- 20 20. Zardi et al. *EMBO J.*, 6: 2337-2342, 1987.
21. French-Constant et al. *J.Cell Biol.*, 109: 903-914, 1989.
22. Castellani et al. *Int J Cancer*, 59: 612-618, 1994
23. Tarli et al. *Blood*, 94:192-198, 1999.
24. Carnemolla et al. *Int J Cancer*, 68: 397-405, 1996
- 5 25. Viti et al. *Cancer Res*, 59: 347-353, 1999.
26. Neri et al. *Nature Biotechnol*, 15: 1271-1275, 1997.
27. Demartis et al. *Eur J Nucl Med*, 28: 4534-4539, 2001.
28. Birchler et al. *Nat Biotechnol*, 17: 984-988, 1999
29. Nilsson et al. *Cancer Res.*, 61: 711-716, 2001.
- 0 30. Halin et al. *Nature Biotechnol*. In the press, 2002.
31. Carnemolla et al. *Blood*, 99 :, 2002
32. Wu et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 8495-8500, 2000.

33. Li et al. Protein Engineering, 10: 731-736, 1997
34. Pini et al. J. Immunol. Methods, 206: 171-183, 1997.
35. Batista et al. J. Exp. Med., 184: 2197-205, 1996.
36. Riske et al. J. Biol. Chem., 266: 11245-11251, 1991.
- 5 37. Bosslet et al. Cancer Res., 58:1195-1201, 1998.
38. Jain and Baxter. Cancer Res., 48: 7022-7032, 1988.
39. Jain. Vascular and interstitial physiology of tumors. Role
in cancer detection and treatment. In: R.Bicknell, C.E.
Lewis and N. Ferrara (eds). Tumour Angiogenesis, pp. 45-
10 59. New York: Oxford University Press, 1997.
40. Jain. Annu. Rev. Biomed. Eng., 1: 241-263, 1999.
41. Turner and Kinet. Nature, 402 Suppl., B24-B30, 1999.
42. Vangelista et al. Jour. Clin. Invest., 103:1571-1578,
1999.
- 15 43. Garman et al. Nature, 406: 259-266, 2000.
44. Hu et al. Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996.
45. Magnani et al. Br. J. Cancer, 82: 616-620, 2000.

103

Table 1. Immunoreactivity (I*) and radioactivity recovery (R) from Superdex 200 of the radiolabeled antibodies, at different times after i v Injection

Time (h)	3		6		24		48		72		144	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
L19(scFv)	36	54	32	58	27	nd	14	nd	9	nd	4	nd
L19SIP	100	100	100	96	100	94	95	96	100	nd	95	nd
L19IgG1	100	100	100	100	95	100	100	100	100	100	95	100

84

- Immunoreactivity (%) and radioactivity recovery (%) from Superdex200 were determined in plasma as described in Materials and Methods
- *To normalize, the results of the immunoreactivity test are referred to the percentage values of the immunoreactivity before i v Injection
- nd not determined

75

Table 2 a. Biodistribution expernents of radiolabeled L19 and D1 3 antibody fragments in SK-MEL-28 tumor-bearing mice

L19(scFv)	3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR	2,47 ± 0,05	2,01 ± 0 72	1,82 ± 0,43	0,95 ± 0,14	0,68 ± 0,04	0,32 ± 0,14
Blood	1,45 ± 0,58	0,54 ± 0,12	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0 02	0,03 ± 0,01
Liver	0,45 ± 0,20	0,18 ± 0,05	0,04 ± 0 01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Spleen	0,57 ± 0,28	0,27 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Kidney	4,36 ± 0,32	1,57 ± 0,08	0,16 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,00
Intestine	0,77 ± 0,21	0,57 ± 0,05	0,24 ± 0,06	0,17 ± 0 04	0,12 ± 0,05	0,09 ± 0,01
Heart	0,77 ± 0,20	0,31 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Lung	2,86 ± 0,34	1,80 ± 0,87	1,07 ± 0,42	0,73 ± 0,39	0,55 ± 0,11	0,51 ± 0,22

D1.3(scFv)	3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR	1,03 ± 0,74	0,87 ± 0,42	0,15 ± 0,10	0,07 ± 0,02	nd	nd
Blood	1,52 ± 0,88	0,81 ± 0 13	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	nd	nd
Liver	1,19 ± 0,85	0,86 ± 0,28	0,14 ± 0,04	0,03 ± 0,08	nd	nd
Spleen	1,06 ± 0,88	0,42 ± 0,33	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0 01	nd	nd
Kidney	3,01 ± 2,48	1,83 ± 0,78	0,48 ± 0,01	0,15 ± 0,05	nd	nd
Intestine	0,86 ± 0,54	0,66 ± 0,13	0,17 ± 0,03	0,02 ± 0,01	nd	nd
Heart	0,88 ± 0,54	0,55 ± 0,84	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	nd	nd
Lung	1,28 ± 0,85	1,06 ± 0,86	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	nd	nd

The results are expressed as percent of antibody injected dose per gram of tissue (%ID/g)±SD
nd not determined

Table 2 b. Blodistribution experiments of radiolabeled L19-SIP and D1 3-SIP in SK-MEL-28 tumor-bearing mice

L19 SIP	3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR	5,23 ± 0,65	8,14 ± 2,23	4,20 ± 2,47	2,57 ± 0 31	2,33 ± 0,80	1,48 ± 0 65
Blood	9,82 ± 0,88	8,93 ± 0,62	1,39 ± 0,08	0,29 ± 0,04	0,08 ± 0 02	0,02 ± 0 01
Liver	2,85 ± 0,14	1,74 ± 0,31	0,50 ± 0 04	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Spleen	3,78 ± 0,38	2,43 ± 0,24	0,71 ± 0,05	0,28 ± 0,04	0,13 ± 0 01	0,17 ± 0 18
Kidney	7,33 ± 0,81	3,87 ± 0,21	1,08 ± 0,05	0,30 ± 0 04	0,14 ± 0 02	0,05 ± 0 01
Intestine	1,45 ± 0 24	1,44 ± 0,29	1,08 ± 0,43	0,56 ± 0,08	0,40 ± 0,08	0,18 ± 0,00
Heart	4,18 ± 0,30	2,15 ± 0 08	0,52 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Lung	7,72 ± 0,60	5,41 ± 0,55	1,81 ± 0,40	0,59 ± 0,29	0,19 ± 0 03	0,05 ± 0,01

D1 3SIP	3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR	3,80 ± 0,30	1,85 ± 0,12	0,70 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,07 ± 0 01	0,04 ± 0,03
Blood	10,40 ± 0,81	4,45 ± 0,14	1,21 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Liver	4,05 ± 0,88	2,73 ± 0,33	1,43 ± 0,07	0,51 ± 0,21	0,15 ± 0,08	0,02 ± 0 01
Spleen	3,31 ± 0,66	1,76 ± 0,50	0,82 ± 0 12	0,46 ± 0,20	0,16 ± 0,05	0,04 ± 0 02
Kidney	8,41 ± 0,49	4,64 ± 0,06	1,47 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,06 ± 0,01
Intestine	2,03 ± 0,55	1,08 ± 0,20	1,02 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,04
Heart	3,28 ± 0,20	1,81 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Lung	8,16 ± 0,28	4,62 ± 0,07	1,16 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01

The results are expressed as percent of antibody injected dose per gram of tissue (%ID/g)±SD
nd not determined

7-7

Table 2 c. Biodistribution experiments of radiolabeled L19IgG1 and hlgG1k in SK-MEL-28 tumor-bearing mice

L19 IgG1	3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR	4,48 ± 0,08	5,39 ± 1,01	6,70 ± 2,10	7,80 ± 2,51	8,90 ± 2,52	11,22 ± 3,19
Blood	16,04 ± 0,81	12,02 ± 1,85	8,31 ± 1,77	6,12 ± 1,42	5,02 ± 3,81	4,87 ± 0,28
Liver	6,03 ± 0,37	6,77 ± 0,53	2,41 ± 0,35	1,46 ± 0,41	1,26 ± 0,71	1,08 ± 0,18
Spleen	6,63 ± 1,34	6,37 ± 1,37	2,51 ± 0,47	2,01 ± 0,32	1,80 ± 1,02	1,51 ± 0,29
Kidney	6,47 ± 0,38	5,12 ± 0,47	3,07 ± 0,35	1,73 ± 0,63	1,64 ± 1,14	1,12 ± 0,44
Intestine	1,80 ± 0,39	1,35 ± 0,65	1,43 ± 0,19	1,13 ± 0,32	1,13 ± 0,98	0,87 ± 0,47
Heart	6,63 ± 0,67	4,77 ± 0,52	2,67 ± 0,45	1,48 ± 0,51	1,32 ± 1,09	0,92 ± 0,37
Lung	6,55 ± 0,65	5,16 ± 0,62	4,18 ± 0,65	2,28 ± 0,80	1,98 ± 1,60	1,42 ± 0,45

hlgG1k	3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR	nd	3,28 ± 0,38	4,00 ± 0,22	2,78 ± 0,20	nd	2,32 ± 0,26
Blood	nd	10,12 ± 0,35	7,87 ± 0,25	6,24 ± 0,34	nd	5,41 ± 0,51
Liver	nd	4,02 ± 0,09	2,08 ± 0,10	1,90 ± 0,24	nd	1,28 ± 0,03
Spleen	nd	4,47 ± 0,28	1,82 ± 0,01	1,42 ± 0,19	nd	1,24 ± 0,03
Kidney	nd	5,40 ± 0,19	2,58 ± 0,06	2,08 ± 0,22	nd	1,30 ± 0,15
Intestine	nd	0,72 ± 0,07	0,48 ± 0,05	0,38 ± 0,03	nd	0,31 ± 0,01
Heart	nd	3,90 ± 0,15	2,52 ± 0,21	0,99 ± 0,18	nd	1,48 ± 0,13
Lung	nd	4,82 ± 0,82	3,84 ± 0,08	1,75 ± 0,32	nd	1,08 ± 0,13

The results are expressed as percent of antibody injected dose per gram of tissue (%ID/g)±SD
nd not determined

106

WO 2005/023118

67

PCT/EP2004/009733

7/3

Table 3. Tumor-organ ratios of the % ID/g of the radiolabeled L19 antibody formats in SK-MEL-28 tumor-bearing mice

	L19(ScFv)						L19SIP						L19IgG1					
Time(h)	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144
TUMOR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Blood	1,7	3,7	16,2	23,7	22,7	10,7	0,8	1,2	3,0	8,9	28,1	74,8	0,3	0,4	0,8	1,8	1,8	2,3
Liver	6,1	11,1	40,6	47,8	34,0	16,0	2,0	3,6	8,4	13,6	23,3	28,8	0,7	0,8	2,8	6,4	7,1	6,3
Spleen	3,7	7,4	23,1	31,6	34,0	16,0	1,4	2,6	8,9	10,0	17,9	8,8	0,7	0,8	2,7	3,9	4,9	7,4
Kidney	0,8	1,2	10,1	18,8	17,0	10,7	0,7	1,8	3,8	8,6	16,8	29,8	0,7	1,0	2,2	4,6	6,8	6,3
Intestine	3,2	3,6	6,7	8,6	8,7	3,6	2,6	4,3	4,0	4,8	6,8	8,3	2,8	4,0	4,7	8,9	7,9	7,1
Heart	3,2	6,6	23,1	47,6	34,0	16,0	1,3	2,8	8,1	20,0	38,8	74,8	0,8	1,1	2,3	6,3	6,7	6,8
Lung	0,9	1,3	1,8	1,3	1,2	0,8	0,7	1,1	2,3	4,3	12,3	28,8	0,7	1,0	1,8	3,4	4,6	3,7

68

PCT/EP2004/009733

W/O 2005/023318

107

28

Table 4
Kinetic parameters for blood clearance of the three L19 antibody formats

	α		β	
	(%) ^{a)}	$t_{1/2}$ (h)	(%) ^{a)}	$t_{1/2}$ (h)
L19(scFv)	96,7	0,53	3,3	8,00
L19-SiP	83,7	1,06	16,3	10,66
L19-IgG1	76,9	1,48	23,1	106,7

89

^{a)} Relative magnitude of the two half-life components

Table 5. Biodistribution experiments of radiolabeled L19(scFv) and L19SIP in F9 tumor-bearing mice

L19(scFv)	3h	6h	24h	48h
TUMOR	10,46 ± 1,76	8,15 ± 2,63	3,18 ± 0,63	2,83 ± 0,71
Blood	2,06 ± 0,38	1,88 ± 1,14	0,17 ± 0,01	0,08 ± 0,02
Liver	1,62 ± 1,67	0,73 ± 0,51	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Spleen	1,83 ± 0,36	0,90 ± 0,64	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Kidney	12,70 ± 0,73	4,37 ± 0,88	0,24 ± 0,03	0,18 ± 0,08
Intestine	0,88 ± 0,15	0,95 ± 0,23	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,08
Heart	1,35 ± 0,21	0,81 ± 0,38	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Lung	2,88 ± 0,28	2,08 ± 0,68	0,38 ± 0,60	0,33 ± 0,06
L19SIP	3h	6h	24h	48h
TUMOR	17,46 ± 1,83	16,66 ± 2,59	15,32 ± 2,17	12,00 ± 1,81
Blood	13,61 ± 0,67	8,82 ± 1,18	1,73 ± 0,02	1,14 ± 0,20
Liver	2,81 ± 0,37	2,38 ± 0,13	0,54 ± 0,14	0,32 ± 0,00
Spleen	3,42 ± 0,28	2,88 ± 0,27	0,81 ± 0,09	0,37 ± 0,01
Kidney	8,18 ± 0,78	5,86 ± 0,60	1,18 ± 0,05	0,78 ± 0,08
Intestine	0,95 ± 0,03	1,38 ± 0,21	0,83 ± 0,11	1,04 ± 0,14
Heart	4,84 ± 0,24	3,87 ± 0,46	0,87 ± 0,08	0,48 ± 0,07
Lung	5,81 ± 0,01	5,83 ± 0,57	1,86 ± 0,19	0,81 ± 0,08

The results are expressed as percent of antibody injected dose per gram of tissue (%ID/g)±SD and not determined

70

	% of dose / g of tissue		
	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
Spleen	5.05 ± 1.04	4.27 ± 0.27	4.88 ± 1.77
Liver	10.80 ± 1.52	10.57 ± 1.44	10.88 ± 1.51
Kidney	14.30 ± 1.45	16.71 ± 2.42	22.48 ± 6.79
Lung	9.84 ± 1.72	8.15 ± 0.80	3.03 ± 0.95
Stomach without contents	1.10 ± 0.13	1.82 ± 0.19	1.88 ± 0.24
Intestine with contents	1.87 ± 0.14	2.65 ± 0.30	2.84 ± 1.40
Tumour	12.93 ± 2.78	10.18 ± 2.28	12.98 ± 3.13
Blood	17.10 ± 1.49	9.08 ± 0.86	1.88 ± 0.47

Table 6




	% of dose / g of tissue		
	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
Spleen	8.92 ± 1.3	8.37 ± 0.23	2.08 ± 0.48
Liver	14.85 ± 0.81	12.43 ± 0.37	4.62 ± 0.52
Kidney	22.07 ± 1.87	18.89 ± 1.10	6.82 ± 1.18
Lung	10.08 ± 1.87	8.33 ± 0.49	1.32 ± 0.28
Stomach without contents	2.18 ± 0.38	2.12 ± 0.08	1.18 ± 0.08
Intestine with contents	3.03 ± 0.25	3.62 ± 0.68	1.20 ± 0.12
Tumour	17.20 ± 7.49	18.79 ± 5.35	8.42 ± 3.84
Blood	16.63 ± 2.04	7.42 ± 0.21	0.73 ± 0.14

Table 7

	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
Tumour to blood ratio	1.01 ± 0.33	2.54 ± 0.74	12.81 ± 4.03

Table 8

CLAIMS:

1. A specific binding member that binds human ED-B, wherein the specific binding member is labelled with an isotope
5 selected from the group consisting of ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I and ²¹¹At and comprises an antigen-binding site that comprises an antibody VH domain and an antibody VL domain, wherein the antibody VH domain is selected from the group consisting of the L19 VH domain, and a VH domain comprising a VH CDR1, a VH
10 CDR2 and a VH CDR3, wherein the VH CDR3 is the L19 VH CDR3 of SEQ ID NO. 3, the VH CDR1 is optionally L19 VH CDR1 of SEQ ID NO. 1, and the VH CDR2 is optionally L19 VH CDR2 of SEQ ID NO. 2; and wherein the antibody VL domain is optionally selected from the group consisting of the L19 VL domain, and a VL
15 domain comprising a VL CDR1, a VL CDR2 and a VL CDR3, wherein the VL CDR3 is the L19 VL CDR3 of SEQ ID NO. 6, the VL CDR1 is optionally L19 VL CDR1 of SEQ ID NO. 4, and the VL CDR2 is optionally L19 VL CDR2 of SEQ ID NO. 5; the L19 VH domain and L19 VL domain sequences being disclosed in Pini et al. (1998)
20 *J. Biol. Chem.* 273: 21769-21776; wherein the specific binding member comprises a mini-immunoglobulin comprising said antibody VH domain and antibody VL domain fused to ϵ_{s2} -CH4 and dimerized or comprises a whole IgG1 antibody molecule.
- 25 2. A specific binding member according to claim 1 comprising an antibody VH domain comprising the VH CDR's with the amino acid sequences of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 and SEQ ID NO. 3, which specific binding member competes for binding to ED-B with an ED-B-binding domain of an antibody comprising the L19
30 VH domain and the L19 VL domain.
3. A specific binding member according to claim 1 or claim 2 comprising the L19 VH domain.

4. A specific binding member according to claim 3 comprising the L19 VL domain.

5. A specific binding member according to any one of the preceding claims which is a mini-immunoglobulin comprising ϵ_{82} -CH4.

6. A specific binding member according to claim 5 wherein the antibody VH domain and antibody VL domain are within an scFv antibody molecule fused to ϵ_{82} -CH4.

7. A specific binding member according to claim 6 wherein the scFv antibody molecule is fused to ϵ_{82} -CH4 via a linker peptide.

8. A specific binding member according to claim 7 wherein the linker peptide has the amino acid sequence GGSG (SEQ ID NO. 7).

9. A specific binding member according to any one of claims 1 to 4 that comprises a whole IgG1 antibody molecule.

10. A specific binding member according to any of claims 1 to 9 wherein the isotope is ^{131}I .

11. A method of producing a specific binding member according to any one of claims 1 to 10, the method comprising labelling a specific binding member with an isotope selected from the group consisting of ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I and ^{211}At .

12. A method according to claim 11, wherein the labelling comprises oxidising a halogenide selected from the group

consisting of $^{76}\text{Br}^-$, $^{77}\text{Br}^-$, $^{123}\text{I}^-$, $^{124}\text{I}^-$, $^{131}\text{I}^-$ and $^{211}\text{At}^-$ in the presence of the specific binding member.

13. A method according to claim 11, wherein the labelling
5 comprises conjugating an activated bi-functional halogen carrier containing a radioisotope selected from the group consisting of ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I and ^{211}At to a lysine or a cysteine residue or to the N terminus of the specific binding member.

10 14. A method according to any one of claims 11 to 13, wherein the method comprises expressing nucleic acid encoding the specific binding member prior to the labelling.

15. A method according to claim 14, comprising culturing host cells under conditions for production of the specific binding member.

16. A method according to any one of claims 11 to 15, further
0 comprising isolating and/or purifying the specific binding member.

17. A method according to any one of claims 11 to 16 further comprising formulating the specific binding member into a
1 composition including at least one additional component.

18. A method according to any one of claims 11 to 17 further comprising binding the specific binding member to ED-B or a fragment of ED-B.

19. A method comprising binding a specific binding member that binds ED-B according to any one of claims 1 to 10 to ED-B or a fragment of ED-B.

20. A method according to claim 18 or claim 19 wherein said binding takes place *in vitro*.

5 21. A method according to any one of claims 18 to 20 comprising determining the amount of binding of specific binding member to ED-B or a fragment of ED-B.

10 22. A composition comprising a specific binding member according to any one of claims 1 to 10, for use in a method of treatment of the human or animal body by therapy.

23. A composition according to claim 22 for use in a method of treatment of a lesion of pathological angiogenesis.

15

24. A composition according to claim 22 for use in a method of treatment of a tumor.

20 25. A composition according to any one of claims 1 to 10 for use in a method of diagnosis.

26. Use of a specific binding member according to any one of claims 1 to 10 in the manufacture of a medicament for treating a lesion of pathological angiogenesis.

25

27. Use of a specific binding member according to any one of claims 1 to 10 in the manufacture of a medicament for treating a tumor.

10 28. Use of a specific binding member according to any one of claims 1 to 10 in the manufacture of a diagnostic reagent.

1/6

Figure 1A

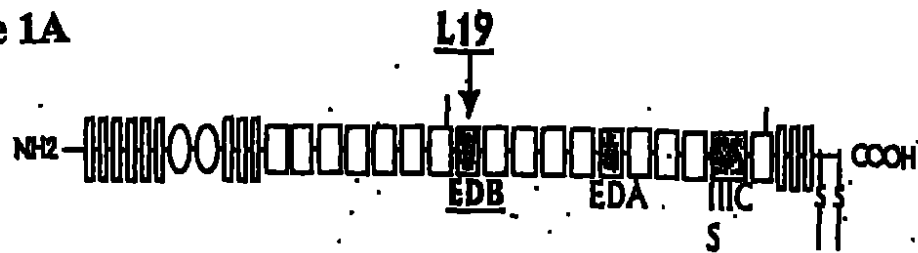


Figure. 1B

L19scFv/pDN322

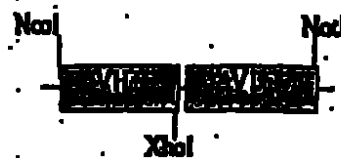


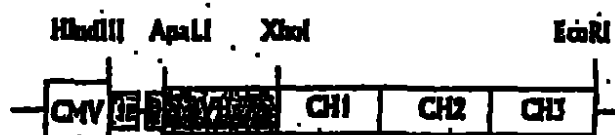
Figure 1C

L19SIP/pCDNA3

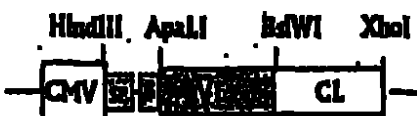


Figure 1D

L19HIgG1/pcDNA3



L19KL/pCMV2Δ



2/6

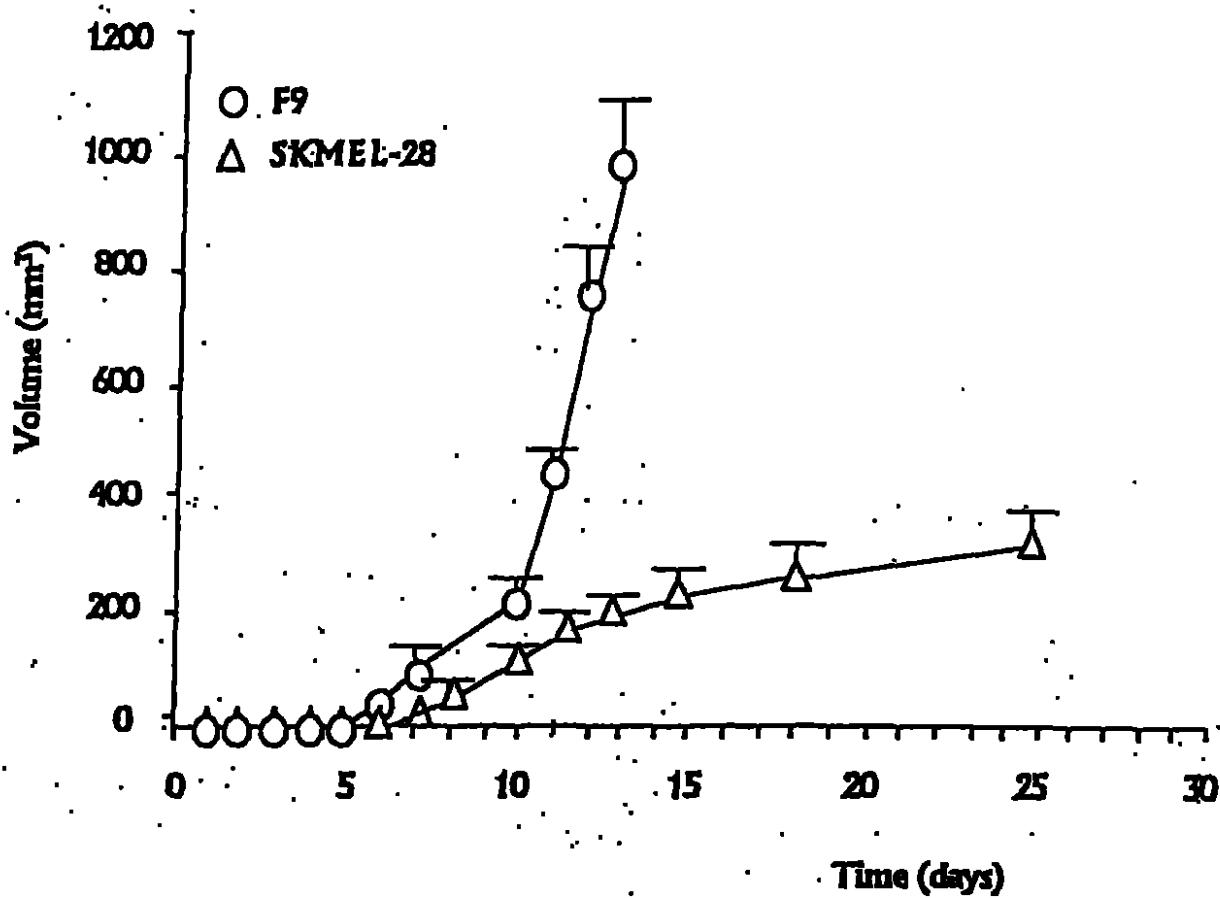


Figure 2

3/6

Figure 3A

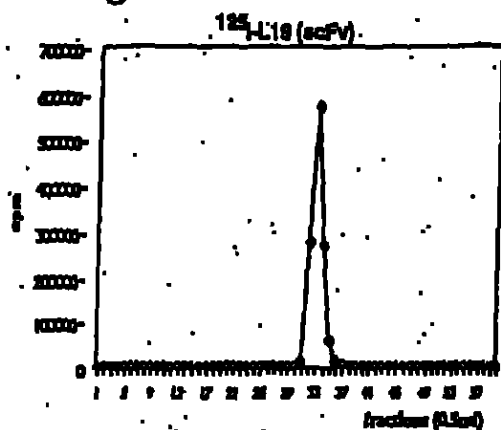


Figure 3D

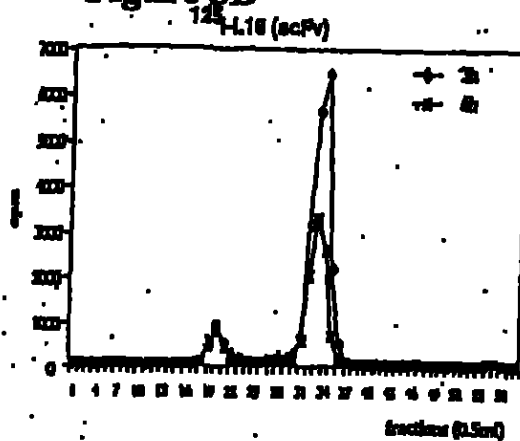


Figure 3B

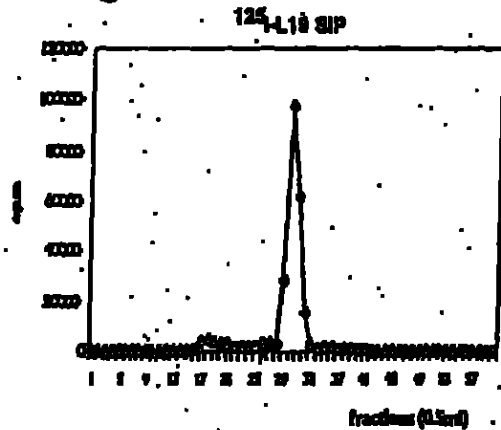


Figure 3E

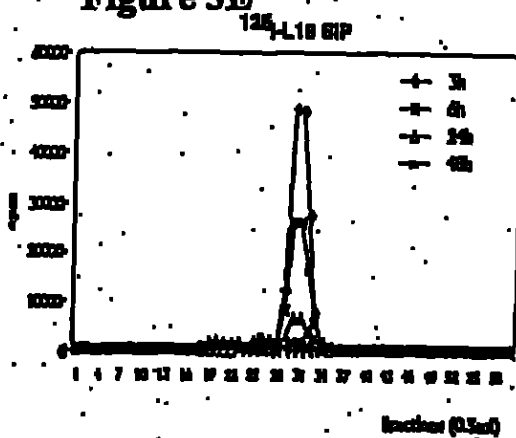


Figure 3C

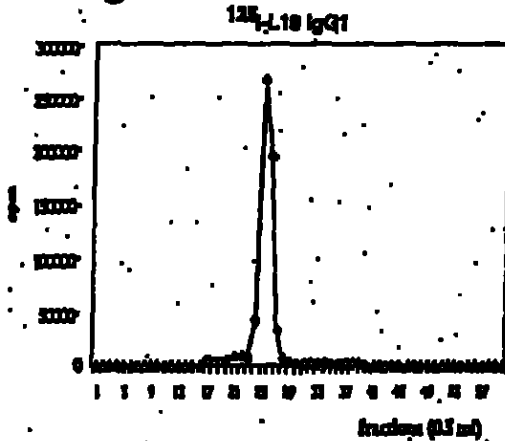
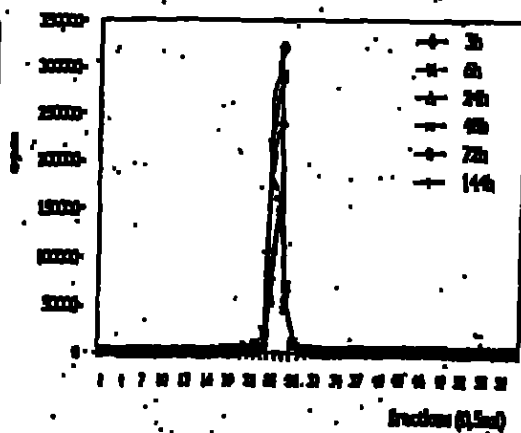


Figure 3F ^{125}I -L18 IgG1



72
120

4/8

Figure 4A

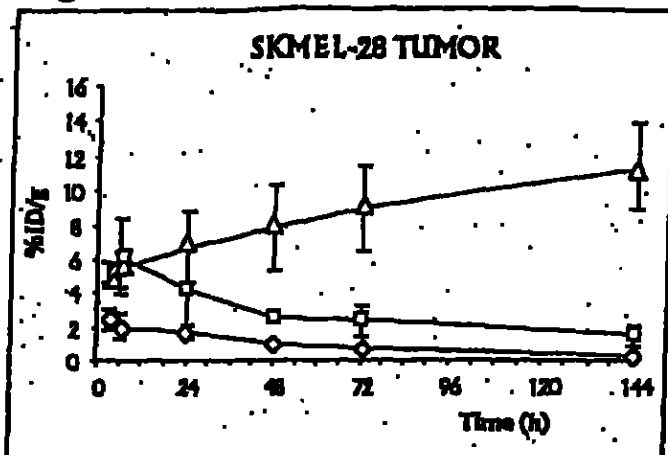


Figure 4B

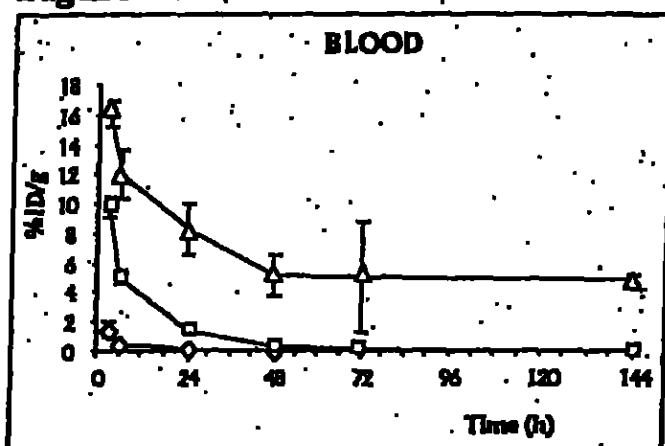
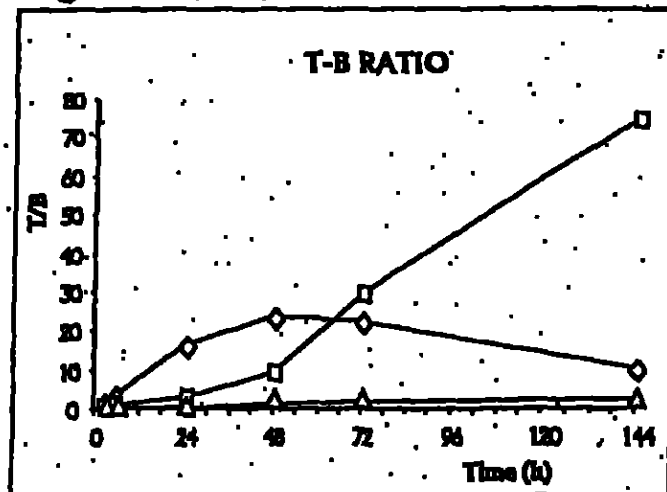


Figure 4C



5/8

Figure 5A

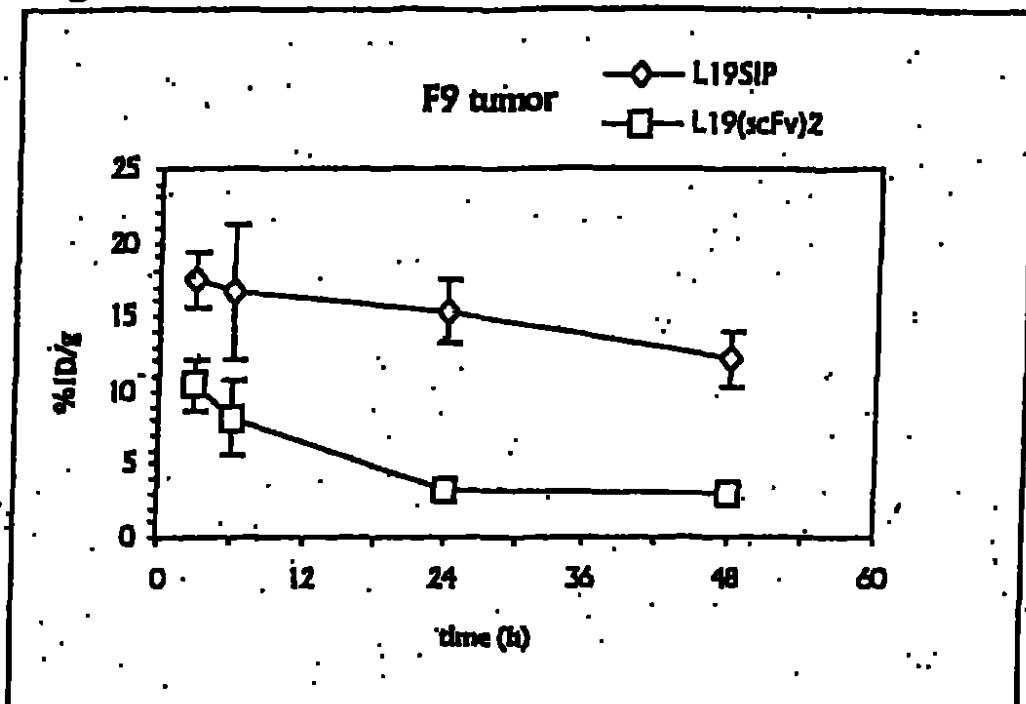
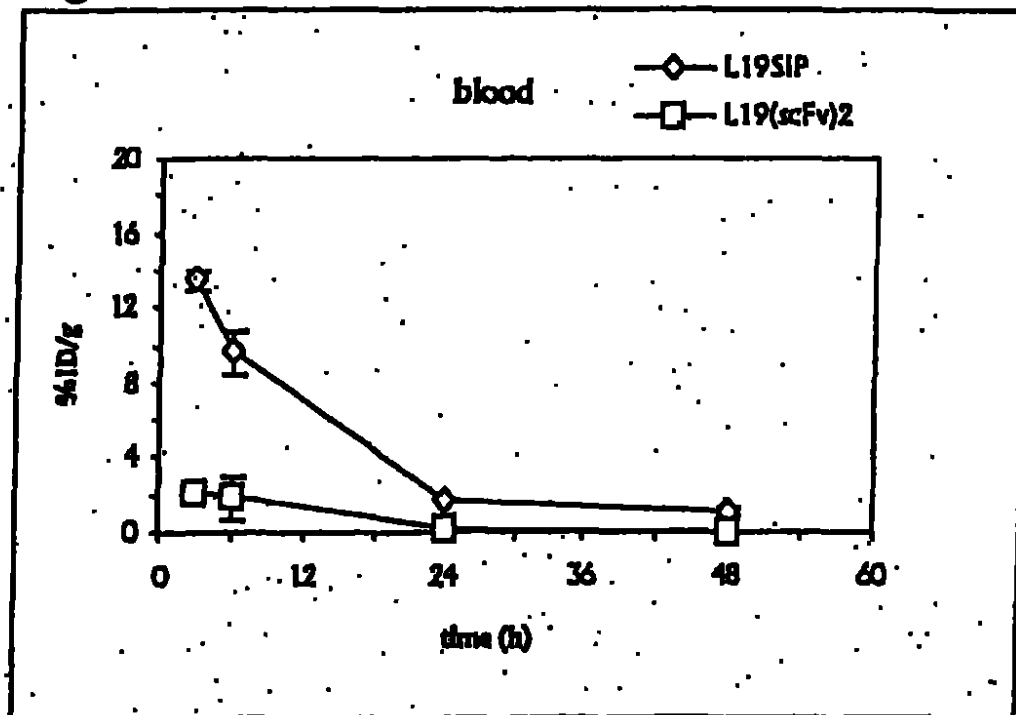


Figure 5B



6/6

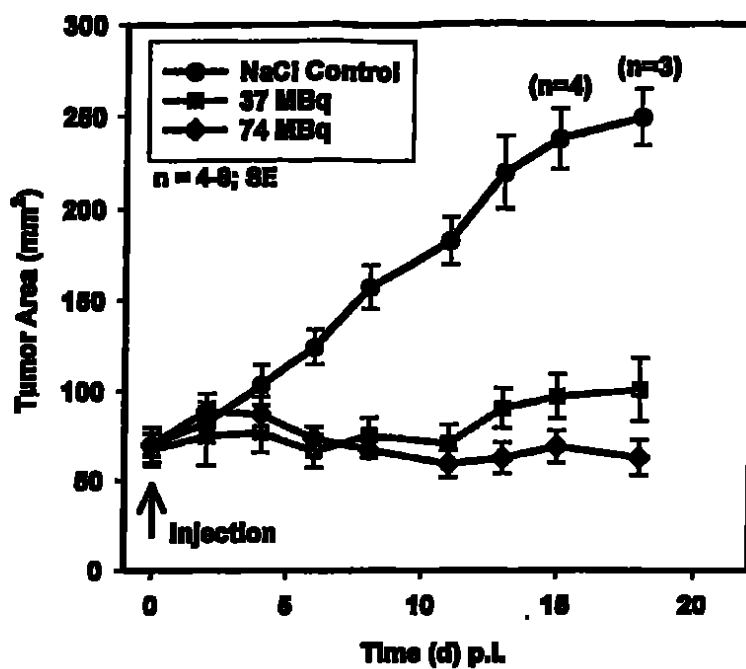


Figure 6

SEQUENCE LISTING

5 <110> Philogen SRL
 Schering AG
 Borsi, Laura
10 Carnemolla, Barbara
 Balza, Enrica
15 Castellani, Patrizia
 Zardi, Luciano
 Friebe, Matthias
20 Hilger, Christoph-Stephan

25 <120> Selective targeting of tumor vasculature using radiolabelled
 antibody molecules

30 <130> SMWFP6177075

 <140> EP 03255633.4
 <141> 2003-09-10
35 <140> US 60/501,881
 <141> 2003-09-10

40 <150>
 <151>

 <160> 13
45

 <170> PatentIn version 3.1

50

 <210> 1
 <211> 5
55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

~~8~~
124

<400> 1

5 Ser Phe Ser Met Ser
1 5

<210> 2

10 <211> 17

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

25 Gly

<210> 3

30 <211> 7

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 3

40 Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5

45 <210> 4

<211> 12

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

97
125

<210> 5
<211> 7
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
10
<400> 5
Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
15 1 5
<210> 6
20 <211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 6
30 Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
1 5 10
<210> 7
35 <211> 4
<212> PRT
40 <213> Artificial sequence
<220>
45 <223> Linker peptide
<400> 7
50 Gly Gly Ser Gly
1
<210> 8
55 <211> 35
<212> DNA

<213> Artificial sequence

5 <220>

<223> Primer

<400> 8 35

10 gtgtgcactc ggaggtgcag ctgttggagt ctggg

<210> 9

15 <211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

25 <223> Primer

<400> 9 36

gcctccggat ttgatttcca ccttggtccc ttggcc

30 <210> 10

<211> 33

35 <212> DNA

<213> Artificial sequence

40

<220>

<223> Primer

45 <400> 10 33

ctcgtgcaot cgcaggtgca gctgcaggag tca

50 <210> 11

<211> 30

<212> DNA

55 <213> Artificial sequence

99
127

	<220>		
	<223> Primer		
5	<400> 11		
	ctctccggac cgtttgatct cgcgcttggt		30
	<210> 12		
10	<211> 33		
	<212> DNA		
15	<213> Artificial sequence		
	<220>		
20	<223> Primer		
	<400> 12		
25	tggtgtgcac tcggaaattg tgttgacgca gtc		33
	<210> 13		
	<211> 30		
30	<212> DNA		
	<213> Artificial sequence		
35	<220>		
	<223> Primer		
40	<400> 13		
	ctctcgtaag tttgatttcc accttggtcc		30
45			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
EP/2004/009733A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K51/10 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BORSI L ET AL: "Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 102, no. 1, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 75-85, XP002252051 ISSN: 0020-7136 page 76; figures 1,4 page 84 page 77, column 2, paragraph 2 see discussion — — — — — — / —	1-9, 11-19, 22-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 2005

Date of mailing of the international search report

14/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-6040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-6016

Authorized officer

Gonzalez Ramon, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

EP2004/009733

129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEMARTIS S. ET AL: "Selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin" EUR. J. NUCL. MED., vol. 28, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 534-539, XP001184113 cited in the application abstract page 535 - page 536; figure 1 see discussion	1-4, 11-17, 22-24, 26,27
X	SANTIMARIA M. ET AL: "Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer" CLIN. CANCER RES., vol. 9, February 2003 (2003-02), pages 571-579, XP001184112 abstract page 572, column 1, paragraph 3 - page 572, column 2, paragraph 2 see discussion	1-9, 11-19, 22-28
X	WO 03/055917 A (BERNDORFF DIETMAR ;DINKELBORG LUDGER (DE); HILGER CHRISTOPH-STEPAN) 10 July 2003 (2003-07-10) page 8; claims 5,6,14,15; table 1 page 16; example 15	1-4,9, 11-28
P,X	WO 03/076469 A (SCHERING AG ;FRIEBE MATTHIAS (DE); HILGER CHRISTOPH-STEPHAN (DE);) 18 September 2003 (2003-09-18) page 29 - page 30; claims 1-10,15-26; figure 1	1-9, 11-28
X	WO 01/62800 A (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE) 30 August 2001 (2001-08-30) see seq ID 19, seq ID 21claims 11-13,25-27,32,33; figures 6,15,16; examples 3,7	1-4, 11-17, 22-24, 26,27
X	WO 01/96599 A (CASTELLANI PATRIZIA ;ZARDI LUCIANO (IT); PHILOGEN S R L (IT); ZIJL) 20 December 2001 (2001-12-20) pages 32-34; claim 8	18-20
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
EP2004/009733

130

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTY C ET AL: "Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in <i>Pichia pastoris</i> " PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, US, vol. 21, no. 1, February 2001 (2001-02), pages 156-164, XP002242574 ISSN: 1046-5928 page 156, column 2; figure 1	1-28
X	page 159, column 2, paragraph 3 - page 160, column 1, paragraph 1	18-20
Y	LI ERQIU ET AL: "Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP)" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 6, 1997, pages 731-736, XP002252049 ISSN: 0269-2139 see discussion abstract; figure 1	1-28
Y	ORLOVA ANNA ET AL: "Comparative biodistribution of the radiohalogenated (Br, I and At) antibody A33. Implications for in vivo dosimetry" CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 17, no. 4, 2002, pages 385-396, XP008027054 ISSN: 1084-9785 abstract	22-28
Y	ZALUTSKY M R ET AL: "ASTATINE-211-LABELED RADIOTHERAPEUTICS: AN EMERGING APPROACH TO TARGETED ALPHA-PARTICLE RADIOTHERAPY" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 6, September 2000 (2000-09), pages 1433-1455, XP000949215 ISSN: 1381-6128 page 1437, column 2 page 1448, column 2 - page 1449, column 1 -/-	22-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
EP2004/009733

131

C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTY C ET AL: "Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in <i>Pichia pastoris</i> " PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, US, vol. 21, no. 1, February 2001 (2001-02), pages 156-164, XP002242574 ISSN: 1046-5928	1-28
X	page 156, column 2; figure 1 page 159, column 2, paragraph 3 - page 160, column 1, paragraph 1	18-20
Y	LI ERQIU ET AL: "Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP)" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 6, 1997, pages 731-736, XP002252049 ISSN: 0269-2139 see discussion abstract; figure 1	1-28
Y	ORLOVA ANNA ET AL: "Comparative biodistribution of the radiohalogenated (Br, I and At) antibody A33. Implications for in vivo dosimetry" CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 17, no. 4, 2002, pages 385-396, XP008027054 ISSN: 1084-9785 abstract	22-28
Y	ZALUTSKY M R ET AL: "ASTATINE-211-LABELED RADIOTHERAPEUTICS: AN EMERGING APPROACH TO TARGETED ALPHA-PARTICLE RADIOTHERAPY" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 6, September 2000 (2000-09), pages 1433-1455, XP000949215 ISSN: 1381-6128 page 1437, column 2 page 1448, column 2 - page 1449, column 1	22-28
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

/EP2004/009733

132

C-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PINI A ET AL: "Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 34, 21 August 1998 (1998-08-21), pages 21769-21776, XP002124781 ISSN: 0021-9258 cited in the application abstract; table 2	1-28
T	MATTER, C. M. ET AL: "Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin" CIRCULATION RESEARCH, vol. 95, 2004, pages 1225-1233, XP008042282 see discussion page 1226, column 1, paragraph 4	1-9, 11-19, 22-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP/EP2004/009733

133

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03055917	A	10-07-2003	AU 2003210149 A1	15-07-2003
			BR 0306715 A	28-12-2004
			CA 2468081 A1	10-07-2003
			WO 03055917 A2	10-07-2003
			EP 1461360 A2	29-09-2004
			US 2004001790 A1	01-01-2004
WO 03076469	A	18-09-2003	CA 2478414 A1	18-09-2003
			EP 1483297 A2	08-12-2004
			WO 03076469 A2	18-09-2003
WO 0162800	A	30-08-2001	AU 4243201 A	03-09-2001
			CA 2400622 A1	30-08-2001
			WO 0162800 A1	30-08-2001
			EP 1259548 A1	27-11-2002
			JP 2003524018 T	12-08-2003
			US 2003176663 A1	18-09-2003
WO 0196599	A	20-12-2001	AU 8182401 A	24-12-2001
			WO 0196599 A2	20-12-2001

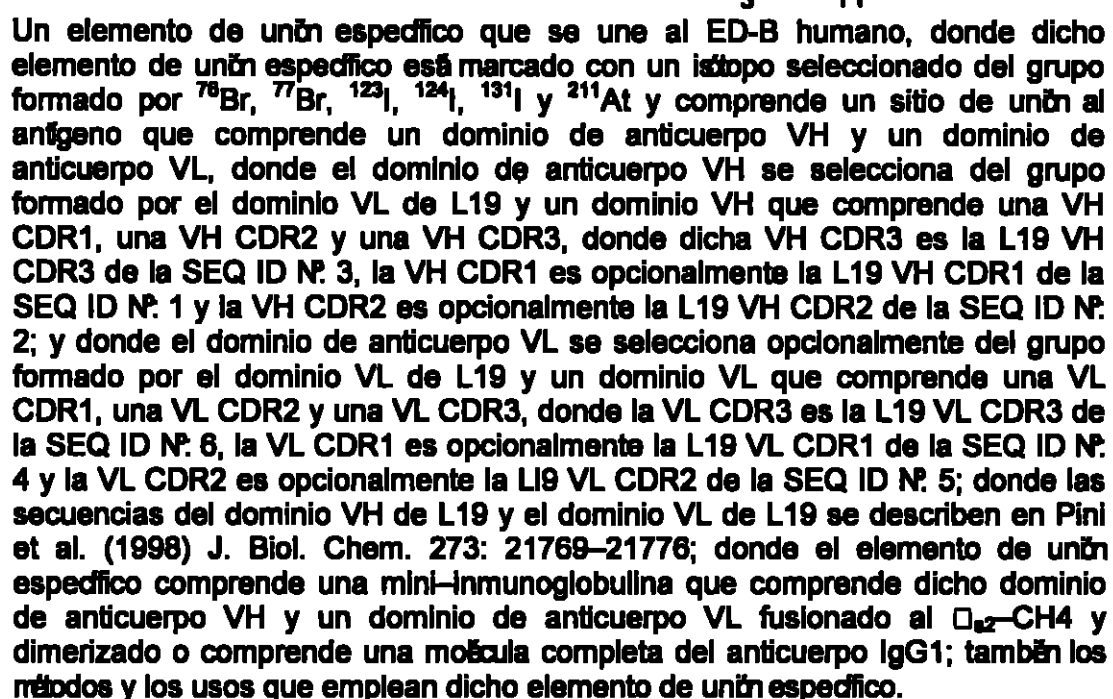
- (12) **Publicación de la solicitud Internacional bajo PCT**
(19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional
(43) **Fecha de publicación Internacional : 17 de marzo de 2005 (17.03.2005)**
(10) **Número de publicación Internacional: WO 2005/023318 A1**
-

- (51) **Clasificación Internacional de patentes: A61K 51/10, A61P 35/00**
(21) **Número de solicitud Internacional: PCT/EP2004/009733**
(22) **Fecha de presentación Internacional: 1 de septiembre de 2004 (01.09.2004)**
(25) **Idioma de la presentación: inglés**
(26) **Idioma de la publicación: Inglés**
(30) **Antecedentes de prioridad:**
03255633.4 del 10 de septiembre 2003 (10.09.2003) EP
60/501,881 del 10 de septiembre 2003 (10.09.2003) US
(71) **Solicitantes (para todos los estados designados con excepción de US): PHILOGEN S.P.A. [IT/IT]; La Lizza 7, I-53100 Siena (IT). SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13353 Berlin (DE).**
(72) **Inventores; y**
(75) **Inventores/solicitantes (solamente US): BORSI, Laura [IT/IT]; Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova (IT). CARNEMOLLA, Barbara [IT/IT]; Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova (IT). BALZA, Enrica [IT/IT]; Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova (IT). CASTELLANI, Patrizia [IT/IT]; Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova (IT). ZARDI, Luciano [IT/IT]; Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova (IT). FRIEBE, Matthias [DE/DE]; Rauschstrasse 8, 13509 Berlin (DE). HILGER, Christoph-Stephan [DE/DE]; Langenauer Weg 24, 13503 Berlin (DE).**
(74) **Agentes: WALTON, Seán et. al.; Mewburn Ellis LLP, York House, 23 Kingsway, London Greater London WC2B 6HP (GB).**
(81) **Estados designados (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**
(84) **Estados designados (en la medida en que no se indique lo contrario, para cada tipo de protección regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Publicado:

- con el informe de búsqueda Internacional
- antes del vencimiento del plazo previsto para modificar las reivindicaciones; la publicación se reiterará en caso de modificaciones

Véanse las explicaciones („Guidance Notes on Codes an Abbreviations“) al comienzo de cada edición regular de la Gaceta-PCT para la explicación del código de dos dígitos y de las otras abreviaturas



**RECONOCIMIENTO DIRIGIDO DE LA VASCULATURA TUMORAL USANDO EL
ANTICUERPO L19 CONTRA ED-B DE FIBRONECTINA MARCADO
RADIOATIVAMENTE**

La presente invención se relaciona con el reconocimiento dirigido [targeting] de la vasculatura tumoral usando moléculas de anticuerpo marcadas radioactivamente. En particular, la invención se relaciona con el uso de moléculas de anticuerpo que se unen a ED-B de fibronectina y que son de utilidad demostrada en el reconocimiento dirigido de tumores. En diferentes realizaciones de la presente invención, se emplean moléculas de anticuerpo en distintos formatos moleculares. En determinadas realizaciones las moléculas de anticuerpo comprenden IgG1 humana. En otras realizaciones, las moléculas de anticuerpo son mini-inmunoglobulinas, tal como las que son generadas por fusión de una molécula de anticuerpo scFv al dominio constante CH4 de una isoforma secretora de la IgE que contiene naturalmente una cisteína en su extremo COOH-terminal que forma un dímero ligado covalentemente. La velocidad de depuración de sangre, la estabilidad *in vivo* y otras propiedades ventajosas se emplean en los diferente aspectos y realizaciones de la invención, por ejemplo en el reconocimiento dirigido de tumores. Se puede aprovechar el comportamiento diferente *in vivo* de las diferentes formas de las moléculas de anticuerpo

para diversos fines de diagnóstico y/o terapéutico, dependiendo de las necesidades clínicas y la enfermedad.

A pesar de su enorme potencial como agentes terapéuticos, los anticuerpos monoclonales (mAbs) de origen no humano no han tenido un buen desempeño en los ensayos clínicos como resultado de su inmunogenicidad (1 Shawlert et al., 1985 2 Miller et al., 1983), sus pobres propiedades farmacocinéticas (3 Hakimi et al., 1991; 4 Stephens et al., 1995) y su ineficacia para reclutar funciones efectoras (5 Riechmann et al., 1988; 6 Junghens et al., 1990). La perspectiva reciente de aislar fragmentos de anticuerpo humano a partir de bibliotecas de expresión en fagos (7 McCafferty et al., 1990; 8 Lowman et al., 1991; para revisiones sobre el tema véase 9 Nilsson et al.; 2000 y 10 Winter et al., 1994) trasciende estos problemas, revitalizando los estudios y haciendo resurgir la esperanza de usar estos reactivos para tratar enfermedades importantes. Aún más, estas moléculas deberían servir como bloques de construcción ideales para nuevas herramientas de diagnóstico y terapéuticos (11 Reichert, 2001; 12 Huls et al., 1999). Aún más, estos anticuerpos pueden ser "madurados" para alcanzar afinidades en el rango picomolar (13 Pini et al., 1998), al menos deseable, si no necesario, para el uso clínico.

Las aplicaciones clínicas con los fragmentos de

anticuerpo humano para una administración selectiva para uso diagnóstico o como agentes terapéuticos requieren, no obstante, de blancos altamente específicos. En el caso de tumores, los blancos más populares son los antígenos de la superficie celular, que habitualmente no son abundantes ni estables. Sin embargo, durante el avance del tumor, el microambiente que rodea a las células tumorales sufre una extensa modificación que genera un "entorno tumoral" que representa un blanco para las terapias de tumores basadas en anticuerpos (14 Neri y Zardi, 1998). De hecho, el concepto que el microambiente tumoral alterado es en sí mismo un carcinógeno que puede ser reconocido y buscado como blanco está ganando cada vez más consenso. Las moléculas que pueden suministrar eficazmente agentes terapéuticos al microambiente tumoral representan entonces nuevas herramientas promisorias e importantes para la terapia del cáncer (15 Bissel, 2001 14 Neri y Zardi, 1998).

La fibronectina es un componente de la matriz extracelular (ECM) que se expresa ampliamente en diversos tejidos y fluidos corporales normales. Se pueden generar diferentes isoformas de FN mediante un procesamiento alternativo del pre-ARNm de la FN, un proceso que es modulado por citoquinas y el pH extracelular (16 Balza et al., 1988; 17 Carnemolla et al., 1989 18 Borsi et al., 1990; 19 Borsi et al., 1995). La repetición completa ED-B

tipo III, también conocido como la repetición B tipo extra III (EIIIB), puede estar incluido, u omitirse, por completo en la molécula de FN (20 Zardi et al., 1987). La ED-B está altamente conservada en las diferentes especies, con un 100% de homología en todos los mamíferos estudiados hasta el momento (humano, rata, ratón, perro) y un 96% de homología con un dominio similar en pollos. La isoforma FN que contiene ED-B (B-FN) no es detectable inmunohistoquímicamente en tejidos adultos normales, con la excepción de tejidos que están sufriendo una remodelación fisiológica (por ejemplo, endometrio y ovario) y durante la cicatrización de heridas (17 Carnemolla et al., 1989 21 ffrench-Constant, et al., 1989). Por el contrario, su expresión en tumores y tejidos fetales es alta (17 Carnemolla et al., 1989). Aún más, se ha demostrado que B-FN es un marcador de la angiogénesis (22 Castellani et al., 1994) y que las células endoteliales que invaden los tejidos tumorales migran a lo largo de las fibras de la ECM que contienen B-FN (23 Tarli et al. 1999).

El reconocimiento dirigido selectivo de la vasculatura tumoral se describió usando un anticuerpo recombinante humano, el scFv(L19) (13 Pini et al., 98), específico de la isoforma B-FN (24 Carnemolla et al., 1996; 23 Tarli et al., 99; 25 Viti et al., 99; 26 Neri et al., 97; 27 Demartis et al., 2001). El anticuerpo se puede usar en enfoques de

diagnóstico *in vivo* (inmunocentellografía) y terapéuticos que abarcan el suministro selectivo de terapéutico radionucleidos o agentes tóxicos a la vasculatura tumoral. Además, Birchler et al. (28 1999) mostraron que el scFv(L19), acoplado químicamente a un fotosensibilizador, se acumula selectivamente en los vasos sanguíneos recién formados del modelo angiogénico de córnea de conejo y, después de irradiar con luz infrarroja cercana, interviene en una oclusión completa y selectiva de la neovasculatura ocular.

Más recientemente, Nilsson et al. (29 2001) informaron que el inmunoconjugado de scFv(L19) con el dominio extracelular del factor tisular interviene en el infarto selectivo en diferentes tipos de modelos de tumores en murinos. Aún más, las proteínas de fusión de scFv(L19) con IL-2 o IL-12 han mostrado una mayor eficacia terapéutica para estas dos citoquinas (30 Halin et al., enviada para su publicación; 31 Carnemolla et al., 2002). Véase también WO 01/62298 por el uso de fusiones en el tratamiento de lesiones de angiogénesis patológica, incluyendo tumores. Finalmente, dado que L19 reacciona igualmente bien con ED-B de ratón y humana, se puede usar en estudios tanto preclínicos como clínicos.

Véase también PCT/GB97/01412, PCT/EP99/03210, PCT/EP01/02062 y PCT/IB01/00382.

Las diferentes formas de anticuerpo han mostrado un comportamiento distinto en términos de estabilidad, depuración y rendimiento *in vivo* en el reconocimiento dirigido de tumores (32 Wu et al., 2000). En (33 Li et al., 1997) se describe una mini-inmunoglobulina o pequeña inmunoproteína (SIP).

La presente invención se basa en la preparación, caracterización e investigación de la biodistribución *in vivo* de moléculas de anticuerpo L19 humanas en diferentes formas, a saber, scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1 completa, y marcación con radioisótopos.

Descripción breve de las figuras

En la figura 1 se muestran modelos que ilustran las estructuras de diferentes proteínas. A: Modelo de la estructura de un dominio de una subunidad de FN. Las secuencias de proteínas que sufren un procesamiento alternativo están indicadas con gris. Tal como se indica, el epítopo del anticuerpo recombinante L19 está localizado dentro de la repetición ED-B. B-D: Esquemas de las construcciones usadas para expresar, respectivamente, L19 (scFv) (B); L19-SIP (C); y L19-IgG1/κ.

En la figura 2 se muestran las curvas de crecimiento del tumor SK-MEL-28 en ratones desnudos (triángulos) y del tumor F9 en la cepa 129 de ratón (círculos). Se grafica el volumen (mm³) versus tiempo (días). Cada punto de dato

representa el promedio de seis ratones $\pm$ DE.

En la figura 3 se muestran los resultados de cromatografía por exclusión de tamaño para las diferentes formas de L19. En los paneles A, B y C se muestran los perfiles de la cromatografía por exclusión del sitio (Superdex 200) de las formas de L19: scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1, respectivamente, después de radioiodación. En los paneles D, E y F se muestran los perfiles de la cromatografía por exclusión de tamaño (Superdex 200) de plasma a los tiempos indicados después de inyección i.v. de las formas radioiodadas de L19, scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1, respectivamente. No se detectaron cambios en los perfiles de las curvas de L19-SIP o L19-IgG1 cuando se cargaba plasma a diferentes tiempos después de la inyección, en tanto 3h después de inyección de L19(scFv)₂ se observó un segundo pico de mayor masa molecular.

En la figura 4 se muestran los resultados de los experimentos de biodistribución en ratones portadores del tumor SK-MEL-28 usando diferentes formas radioiodadas de la molécula de anticuerpo L19. Se informan las variaciones de % ID/g en tumor (Figura 4A) y en sangre (Figura 4B) a los tiempos indicados después de la inyección i.v.. En la figura 4C se grafican las relaciones del % ID/g en tumor-sangre. Las curvas de L19(scFv) están indicadas con rombos, la mini-

inmunoglobulina L19 con cuadrados y la IgG1 L19 con triángulos.

En la figura 5 se muestran los resultados de los experimentos de biodistribución en ratones portadores del tumor F9 usando L19(scFv) (cuadrados) y L19 mini-inmunoglobulina (rombos) radioiodados. Se informan las variaciones del % ID/g en tumor (A) y en sangre (B), a los diferentes tiempos indicados después de la inyección i.v..

En la figura 6 se muestra el cambio en el área del tumor U251 (milímetros cuadrados) en el tiempo (días) después de una inyección de solución salina fisiológica y de I-131-L19-SIP, respectivamente.

La presente invención se relaciona con elementos de unión específicos que se unen a la ED-B humana de la fibronectina, donde dichos elementos de unión específicos están marcados radioactivamente con uno o más isótopos seleccionados del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At . La invención también provee métodos para producir dichos elementos de unión específicos y su uso en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

Los elementos de unión específicos de la invención mostraron propiedades favorables en experimentos con animales, tal como dosis más altas suministradas al tumor en comparación con la médula roja y una gran acumulación en el tumor.

En un aspecto, la presente invención provee un elemento de unión específico que se une a la ED-B humana de fibronectina y que comprende el dominio VH de L19 y un dominio VL, opcionalmente el dominio de VL de L19, donde el elemento de unión específico comprende una mini-inmunoglobulina que comprende dicho dominio de anticuerpo VH y dicho dominio de anticuerpo VL fusionados a ϵ S2-CH4 y dimerizado o comprende una molécula de anticuerpo completa IgG1, y donde el elemento de unión específico está marcado radioactivamente con un isótopo seleccionado del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At . Preferentemente, el radioisótopo es ^{123}I o ^{131}I y con mayor preferencia es ^{131}I .

Se puede ligar una marca radioactiva o una molécula marcada radioactivamente al elemento de unión específico por ejemplo, a un residuo tirosina, lisina o cisteína.

Las secuencias del dominio VH de L19 y del VL dominio de L19 se describen en Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776, donde dichas secuencias se incorporan por completo con referencia a Pini et al. como si se describieran por completo en la presente.

En general, el dominio VH está apareado con un dominio VL para proveer un sitio de unión anticuerpo-antígeno. En una realización preferida, el dominio VH de L19 está apareado con el dominio VL de L19, de modo tal que se forma

un sitio de unión anticuerpo-antígeno que comprende ambos Dominios VH y VL de L19. En otras realizaciones, el VH L19 está apareado con un dominio VL distinto del VL L19. La promiscuidad de las cadenas livianas es un hecho bien establecido en el arte.

Se puede tomar una o más CDR del dominio VH o VL de L19 e incorporarla en un marco adecuado. Esto se describe con mayor detalle más adelante. Las CDR 1, 2 y 3 de VH L19 se muestran en las SEQ ID N°: 1, 2, y 3, respectivamente. Las CDR 1, 2 y 3 de VL L19 se muestran en las SEQ ID N°: 1, 2 y 3, respectivamente.

En una realización preferida, el elemento de unión específico es L19-SIP, con mayor preferencia L19-SIP marcado con ^{123}I (denominado I-123-L19-SIP en la presente) o L19-SIP marcado con ^{131}I (denominado I-131-L19-SIP en la presente).

Las variantes de los dominios VH y VL y las CDR cuyas secuencias se muestran en la presente y que se pueden emplear en los elementos de unión específico para ED-B, se pueden obtener mediante métodos de alteración o mutación y rastreo de las secuencias.

De acuerdo con la presente invención, se pueden emplear variantes de las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en la presente, como se detalla más adelante. Las variantes particulares pueden

incluir una o más alteraciones (adición, supresión, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido) de la secuencia de aminoácidos, menos que 20 alteraciones aproximadamente, menos que 15 alteraciones aproximadamente, menos que 10 alteraciones aproximadamente o menos que aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones se pueden efectuar en una o más regiones de marco de trabajo y/o en una o más CDR.

El elemento de unión específico acorde con la invención puede ser un elemento que compita por la unión al antígeno con un elemento de unión específico que también se una a ED-B y comprende un sitio de unión al antígeno formado por el dominio VH de L19 y el dominio VL de L19. La competencia entre elementos de unión puede evaluarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando un ELISA y/o por marcación con una molécula informante específica de un elemento de unión que pueda ser detectado en presencia de uno o más elementos de unión adicionales no marcados, con el fin de identificar los elementos de unión específicos que se unen al mismo epítopo o un epítopo superpuesto.

Por consiguiente, otros aspectos de la presente invención emplean un elemento de unión específico que comprende un sitio de unión de anticuerpo-antígeno humano que compite con L19 por la unión a ED-B.

El elemento de unión específico de acuerdo con la

presente invención se puede unir a ED-B con al menos la afinidad de L19, donde la afinidad de unión de los diferentes elementos de unión específicos se compara bajo las condiciones apropiadas.

Además de las secuencias de anticuerpo, el elemento de unión específico acorde con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo para formar un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los elementos de unión específicos de la invención pueden llevar una marca detectable o se pueden conjugar con una toxina o una enzima (por ejemplo a través de un enlace peptídico o un ligador).

Para el tratamiento de trastornos o lesiones patológicas por angiogénesis, el elemento de unión específico de la invención se puede conjugar con una molécula tóxica, por ejemplo una molécula biocida o citotóxica que se puede seleccionar entre interleuquina-2 (IL-2), doxorubicina, interleuquina-12 (IL-12), interferón- γ (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) y el factor tisular (preferentemente, un factor tisular truncado, por ejemplo, en los residuos 1-219). Véase, por ejemplo, WO 01/62298.

Los elementos de unión específicos acordes con la invención se pueden usar en un método de tratamiento o de

diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir un tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un elemento de unión específico de la invención. Preferentemente, el elemento de unión específico acorde con la invención es administrado al paciente por administración parenteral. Las afecciones tratables de acuerdo con la presente invención incluyen tumores, en especial tumores sólidos, y otras lesiones patológicas por angiogénesis, incluyendo, artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad y angiomas.

Los elementos de unión específicos son muy adecuados para marcarlos radioactivamente con isótopos seleccionados del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At y para su posterior uso en radiodiagnóstico y radioterapia.

Aún otro aspecto provee un método para producir un elemento de unión específico de la invención, que comprende marcar dicho elemento de unión específico con un radioisótopo seleccionado del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At .

Para marcar radioactivamente al elemento de unión específico de forma directa, se pueden emplear grupos de tirosina presentes en la molécula como blancos. En este

procedimiento particular, el halogenuro, por ejemplo Br^- , I^- , At^- es oxidado con un oxidante apropiado, por ejemplo Iodogen® (tubos recubiertos), esferas con yodo, cloramina-T (sal sódica de N-cloro-p-toluensulfonamida) etc. en presencia del ingrediente farmacéuticamente activo (API).

La marcación indirecta con, por ejemplo, bromo, yodo o astatina se puede efectuar por premarcación de un vehículo de halógeno bi-funcional, preferentemente derivado de, por ejemplo, derivados de ácido benzoico, derivados de Bolton-Hunter, derivados de benceno, etc. El vehículo se puede transformar en una especie activada que será conjugada al grupo s-amino de residuos lisina o al extremo N-terminal de API. Este método indirecto también provee una ruta de síntesis para marcar radioactivamente a compuestos peptídicos de una manera quimioselectiva en el grupo sulfhidrilo de un grupo cisteína. Primero se pueden reducir las moléculas con puente de cisteína con un agente reductor apropiado, por ejemplo, cloruro de estaño(II), Tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), generando grupos cisteína SH libres que pueden reaccionar con el vehículo de halógeno. Como grupos funcionales para la unión se pueden emplear derivados maleimida y α -bromo acetamida.

El método para producir un elemento de unión específico de acuerdo con la invención puede comprender la expresión del ácido nucleico que codifica el elemento de unión

específico antes de marcarlo. Por consiguiente, como un paso anterior, el método para producir el elemento de unión específico puede comprender opcionalmente causar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico codificador, es decir de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el elemento de unión específico. Dicho método puede comprender el cultivo de células huésped bajo condiciones que permiten producir dicho elemento de unión específico.

El método de producción puede comprender un paso de aislamiento y/o purificación del producto. El elemento de unión específico se puede aislar y/o purificar después de su expresión a partir del ácido nucleico, y/o se puede recuperar a partir de células huésped. El aislamiento y/o la purificación pueden ser anteriores a la marcación. Como alternativa o además, el elemento de unión específico se puede aislar y/o purificar después de la marcación.

El método de producción puede comprender la formulación del producto en una composición incluyendo al menos un componente adicional, tal como un excipiente aceptable para uso farmacéutico. Por consiguiente, el elemento de unión específico (marcado) puede ser formulado en una composición incluyendo al menos un componente adicional, tal como un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Estos y otros aspectos de la invención se describirán a continuación con mayor detalle.

TERMINOLOGÍA

Elemento de unión específico

Esto describe a un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específica pueden ser naturales o total o parcialmente sintéticos. Uno de los miembros del par de moléculas tiene un área sobre su superficie, o una cavidad, que se une específicamente y por ello es complementaria de una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Por consiguiente, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. Esta solicitud se refiere a las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

Molécula de anticuerpo

Esta describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida de forma parcial o totalmente sintética. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que comprende un dominio de unión al anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno son por ejemplo Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diabodies [fragmentos diméricos]. La presente invención se relaciona con moléculas de anticuerpo IgG1 completas y con mini-inmunoglobulinas que comprenden κ_2 -CH4.

Se pueden emplear técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir, a partir de una molécula de anticuerpo inicial, otras moléculas de anticuerpo que retienen la especificidad de la molécula de anticuerpo original. Dichas técnicas pueden comprender la introducción de un ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo contra las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones de marco de trabajo, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400.

Como los anticuerpos se pueden modificar de numerosas maneras, se considera que el término "molécula de anticuerpo" abarca cualquier elemento de unión específico o sustancia que tiene un dominio de unión anticuerpo-antígeno con la especificidad requerida. Por consiguiente, este término abarca fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión inmunoglobulina-antígeno, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por ello se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o un equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

Dominio de unión al antígeno

Este describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria de una parte o todo un antígeno. Cuando el antígeno es grande, el anticuerpo se puede unir solamente a una parte particular del antígeno, donde dicha parte se denomina epítope. El dominio de unión al antígeno puede ser provista por uno o más dominios variables del anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo denominado Fd que consiste de un dominio VH). Preferentemente, el dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena liviana (VL) del anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo.

Específico

Este término se puede usar para hacer referencia a la situación en que un miembro de un par de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distinta de sus pares de unión específicos. El término también se aplica cuando, por ejemplo, el dominio de unión del antígeno es específico para un epítope particular contenido en numerosos antígenos, en cuyo caso el elemento de unión específico que contiene el dominio de unión al antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que contienen a dicho epítope.

Comprende

Este término se usa en general en el sentido que

incluye, es decir, que permite la presencia de una o más características o componentes.

Aislado

Se refiere al estado en que los elementos de unión específicos de la invención, o el ácido nucleico que codifica dichos elementos de unión, se encuentran generalmente de acuerdo con la presente invención. Los elementos y el ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres del material con el que están asociados naturalmente, tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los cuales se hallan en su entorno natural, o el entorno en el cual se preparan (por ejemplo, un cultivo celular) cuando dicha preparación se efectúa con tecnología de ADN recombinante ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los elementos y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y aún considerarse aislado a los efectos prácticos: por ejemplo los elementos se mezclan normalmente con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos o se mezclan con vehículos o diluyentes aceptables para uso farmacéutico cuando se usan para diagnóstico o terapia. Los elementos de unión específicos pueden estar glicosilados, ya sea naturalmente o por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NSO (ECACC 85110503) o no glicosiladas (por ejemplo, si son producidos por

expresión en una célula eucariota).

El término "sustancialmente definido" significa que la CDR o dominio VH o VL relevante de la invención será idéntica o altamente similar a las regiones especificadas cuya secuencia se describe en la presente. El término "altamente similar" significa que se pueden efectuar entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 4, tal como entre 1 y 3 ó 1 ó 2, o 3 ó 4, sustituciones en la CDR y/o el dominio VH o VL.

La estructura que lleva la CDR de la invención en general será de una secuencia de una cadena pesada o liviana de un anticuerpo, o una porción sustancial de la misma, donde la CDR está en una ubicación correspondiente a la CDR de los dominios variables VH y VL del anticuerpo natural codificados por genes reordenados de inmunoglobulina. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de la inmunoglobulina se pueden determinar por referencia a (Kabat, E.A. et al, Protein Sequences of Immunological Interest. 5ª Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. [*US Department of Health and Human Services*]. 1991, y actualizaciones de la misma, ahora disponible en Internet (<http://inmuno.bme.nwu.edu> o buscar "Kabat" usando cualquier buscador).

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la CDR sustancialmente definida en la presente es llevada como una CDR en un dominio variable humano o una porción sustancial

de la misma. Las secuencias de L19 VH CDR3 y/o L19 VL CDR3 sustancialmente definidas en la presente, se pueden usar en las realizaciones preferidas de la presente invención y se prefiere que cada una de ellas sea llevada como una CDR3 en un dominio variable de una cadena pesada o liviana humana, según sea el caso, o una porción sustancial del mismo.

La porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con las regiones de marco de trabajo de las mismas. Preferentemente, la porción también incluirá al menos un 50% aproximadamente de cualquiera o ambas primera y cuarta regiones de marco de trabajo, siendo un 50% del extremo C-terminal, un 50% de la primera región de marco de trabajo y el 50% del extremo N-terminal de la cuarta región de marco de trabajo. Puede haber residuos adicionales por el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable que son residuos que no están asociados normalmente con las regiones del dominio variable naturales. Por ejemplo, la construcción de los elementos de unión específicos de la presente invención se puede realizar mediante técnicas de ADN recombinante que dará como resultado la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por ligadores introducidos para facilitar la clonación u otros pasos de manipulación. Dichos otros pasos de manipulación incluyen la introducción de ligadores para

unir os dominios variables de la invención a otras secuencias de proteínas, incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables o marcas de proteína, como se describirá con mayor detalle más adelante.

En una molécula de anticuerpo IgG1 de acuerdo con la presente invención, los dominios VL se pueden unir por el extremo C-terminal a los dominios constantes de la cadena liviana del anticuerpo, incluyendo las cadenas Cκ o Cλ humanas, preferentemente las cadenas Cκ.

Además de estar marcados con ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y/o ^{211}At , los elementos de unión específicos de la invención se pueden marcar con una segunda marca detectable o funcional. Las marcas detectables se describen a continuación, e incluyen radiomarcas tales como radioisótopos de Tecnecio, Indio, Itrio, Cobre, Lutecio o Renio, en particular $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re , ^{188}Re , ^{111}In , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{177}Lu , ^{64}Cu y ^{67}Cu , que se pueden unir a los anticuerpos de la invención usando la química convencional conocida en el arte de detección por imágenes con anticuerpos como se describe en la presente. Otros radioisótopos que se pueden usar incluyen ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{43}Sc , ^{47}Sc , $^{110\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{68}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{121}Sn , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{105}Rh , ^{177}Lu , ^{72}Lu y ^{18}F .

Las marcas también incluyen marcas de enzimas, tal como peroxidasa de rábano picante. Las marcas incluyen además grupos químicos, tal como biotina, que pueden ser detectadas

a través de la unión a un grupo detectable conocido específico, por ejemplo avidina marcada.

A continuación se describe un ejemplo de un protocolo de marcación:

Para marcar radioactivamente los elementos de unión específicos de una forma directa, se reducen primero las moléculas con puente de cisteína utilizando un agente reductor apropiado, por ejemplo cloruro de estaño(II), Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), con lo que se generan grupos de SH-cisteína libres que pueden reaccionar con los isótopos de, por ejemplo, Tc o Re. En este procedimiento particular, los permetalatos obtenidos con el sistema generador son reducidos por un agente reductor, por ejemplo cloruro de estaño(II), en presencia de un ligando auxiliar, por ejemplo tartrato de sodio, y API (los detalles se describen más adelante en la sección experimental).

La marcación indirecta con por ejemplo indio, itrio, lantánidos o tecnecio y renio se puede realizar preconjugando un ligando quelante, preferentemente un derivado de ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminpentaacético (DTPA), ácido ciclohexil-1,2-diamintetraacético (CDTA), ácido etilenglicol-O,O'-bi(2-aminoetil)-N,N,N',N'-diacético (HBED), ácido trietilentetraaminhexaacético (TTHA), ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecan-N,N',N''-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7--

tri-aza-ciclononan-N,N',N''-triacético (NOTA), ácido
1,4,8,12-tetra-aza-ciclotetradecan-N,N',N'',N'''-
tetraacético (TETA), mercaptoacetil diglicina (MAG₂),
mercaptoacetil triglicina (MAG₃), mercaptoacetil glicil-
cisteína (MAGC), cisteinil-glicil-cisteína (CGC), a grupos
amina o tiol del elemento de unión específico. Los ligandos
quelantes poseen un grupo de acoplamiento adecuado, por
ejemplo grupos de ésteres activos, maleimidas, tiocarbamatos
o acetamida α -halogenada. Para conjugar los ligandos
quelantes a los grupos amina, por ejemplo grupos s-NH₂ de
residuos lisina, no se requiere una reducción previa del
compuesto L19-SIP.

Los métodos de marcación de un elemento de unión
específico pueden comprender conjugación de un vehículo de
halógeno bi-funcional activado que contiene un radioisótopo
seleccionado del grupo formado por ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I
y ²¹¹At a un residuo lisina o al extremo N-terminal y a un
residuo cisteína del elemento de unión específico. El método
puede comprender la conjugación del vehículo de halógeno a
un residuo lisina o cisteína del elemento de unión
específico o al extremo N-terminal del elemento de unión
específico. Uno o ambos entre (i) un residuo cisteína y (ii)
un residuo lisina o el extremo N terminal, se pueden marcar
con el mismo radioisótopo o uno diferente de acuerdo con la
invención.

Los elementos de unión específicos de la presente invención están diseñados para su uso en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, preferentemente humanos. Los elementos de unión específicos son especialmente adecuados para su uso en métodos de radioterapia y radiodiagnóstico.

Por lo tanto, otros aspectos de la invención proveen métodos de tratamiento que comprenden la administración de un elemento de unión específico provisto, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho elemento de unión específico y el uso de dicho elemento de unión específico en la elaboración de un medicamento para su administración, por ejemplo, en un método para elaborar un medicamento o una composición farmacéutica que comprende formular el elemento de unión específico con un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

Las indicaciones clínicas en las cuales se puede usar un elemento de unión específico de la invención para proveer un beneficio terapéutico incluyen tumores tal como cualquier tumor sólido, también otras lesiones de angiogénesis patológica, incluyendo artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad y angiomas.

Los elementos de unión específicos de acuerdo con la invención se pueden usar en un método de tratamiento del

cuerpo human o de un animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir un tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un elemento de unión específico de la invención. Preferentemente, el tratamiento es una radioterapia. Las afecciones que pueden ser tratadas de acuerdo con la presente invención se describen en otra parte en la presente.

Los elementos de unión específicos de acuerdo con la invención se pueden usar en una detección por imágenes SPECT, detección por imágenes PET y en una terapia. Los isótopos preferidos para una detección por imágenes SPECT incluyen ^{123}I y ^{131}I . El isótopo preferido para PET es ^{124}I . El ^{131}I es el isótopo preferido para su uso en terapias.

Debido al uso de diferentes isótopos de un elemento para la detección por imágenes y terapias, la biodistribución de los respectivos inmunoconjugados es idéntica. Esto constituye una ventaja en comparación con otros enfoques que emplean derivados marcados con ^{111}In para la detección por imágenes con el fin de predecir la biodistribución de los respectivos derivados terapéuticos marcados con ^{90}Y porque la biodistribución de los correspondientes derivados marcados con ^{111}In e ^{90}Y podría ser diferente; véase Carrasquillo J.A. et al. (1999) J Nucl

Med 40: 268-276.

Por lo tanto, otros aspectos de la invención proveen métodos de tratamiento que comprenden la administración de un elemento de unión específico provisto en la presente, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho elemento de unión específico y el uso de dicho elemento de unión específico en la elaboración de un medicamento para su administración, por ejemplo, en un método de elaboración de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el elemento de unión específico con un excipiente aceptable para uso farmacéutico.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones provistas pueden ser administradas a individuos. La administración es preferentemente de una "cantidad eficaz para uso terapéutico", siendo ésta suficiente como para beneficiar al paciente. Dicho beneficio puede ser al menos el alivio de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la dosis y los tiempos de administración, dependerán de la naturaleza y severidad de lo que está en tratamiento. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones acerca de la dosificación, etc, es responsabilidad de los especialistas practicantes en general y otros profesionales médicos. Las dosis apropiadas de anticuerpo son bien conocidas en el arte; véase Ledermann J.A. et al. (1991) Int J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D,

et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915922.

La composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o sucesivamente dependiendo de la afección a tratar.

Los elementos de unión específicos de la presente invención, incluyendo los que comprenden un dominio de unión anticuerpo-antígeno, pueden ser administrados a un paciente que necesita el tratamiento por cualquier ruta adecuada, habitualmente por inyección en el torrente sanguíneo y/o directamente en el sitio a tratar, por ejemplo un tumor. Preferentemente, el elemento de unión específico se administra por vía parenteral. La dosis precisa dependerá de numerosos factores, de la ruta de tratamiento, del sitio y la ubicación del área a tratar (por ejemplo un tumor), de la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, una molécula de anticuerpo IgG1 completa, una molécula de mini-inmunoglobulina) y de la naturaleza de toda marca detectable u otra molécula unida a la molécula de anticuerpo. La dosis típica de anticuerpo se encontrará en el rango de 10-50 mg.

Esta es la dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ser ajustada proporcionalmente para bebés y niños, y también se puede ajustar para otras formas de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir a intervalos de días, dos

veces por semana, semanalmente o mensualmente, a discreción del profesional a cargo.

Los elementos de unión específicos de la presente invención habitualmente serán administrados en la forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del elemento de unión específico.

Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, vehículo, solución amortiguadora, estabilizante u otros materiales aceptables para uso farmacéutico bien conocidos por los especialistas en el arte. Dichos materiales deberían ser no tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral o por inyección, por ejemplo intravenosa.

Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de la enfermedad, el ingrediente activo se encontrará en la forma de una solución acuosa aceptable para uso parenteral que se encuentre libre de pirógenos y tenga valores de pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los especialistas en el arte podrán preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tal como cloruro de sodio para inyectables, solución de Ringer

para inyectables, solución de Ringer lactato para inyectables. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, soluciones amortiguadoras, antioxidantes y/u otros aditivos, según necesidad.

La composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o sucesivamente dependiendo de la afección a tratar. Dichos otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuado de drogas contra el dolor, tal como drogas anti-inflamatorias no esteroides (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiatos tal como morfina, o anti-eméticos.

La presente invención provee a método que comprende causar o permitir la unión de un elemento de unión específico provista en la presente a ED-B. Tal como se indicara, dicha unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo después de la administración de un elemento de unión específico o de un ácido nucleico que codifica un elemento de unión específico, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en un ELISA, transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad.

Se puede determinar la cantidad de unión del elemento de unión específico a ED-B. La cuantificación puede relacionarse con la cantidad de antígeno en una muestra de

prueba, que puede ser de interés para diagnóstico.

Las reactividades de los anticuerpos para una muestra puede determinarse usando cualquier medio apropiado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno marcado radioactivo se mezcla con antígeno sin marcar (la muestra de prueba) y se deja que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radioactivo unido al anticuerpo. Cuanto más antígeno hay en la muestra de prueba menos antígeno radioactivo se unirá al anticuerpo. También se puede usar un ensayo de unión competitiva con antígeno no radioactivo, usando un antígeno o un análogo ligado a la molécula informante. La molécula informante puede ser un fluoróculo, fósforo o un colorante láser con características de absorción o emisión separadas en el espectro. Los fluoróculos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y rojo Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros informantes incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tal como esferas de látex coloreadas, magnéticas o paramagnéticas y agentes biológica o químicamente activos que pueden generar, directa o indirectamente, señales detectables que pueden ser observadas visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otra manera. Estas moléculas pueden ser

enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian de color o, por ejemplo, que causan cambios en las propiedades eléctricas. Pueden ser molecularmente excitables, de modo tal que las transiciones electrónicas entre los estados de energía dan como resultado espectros de absorción o emisión característicos. Pueden incluir las entidades químicas usadas junto con biosensores. Se puede emplear asimismo los sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por los conjugados individuales de anticuerpo-informante se pueden usar para derivar datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del anticuerpo relevante en las muestras (normal y de prueba).

La presente invención se extiende además a un elemento de unión específico que compite por la unión a ED-B con cualquier elemento de unión específico que se una al antígeno y comprenda un dominio V incluyendo una CDR con la secuencia de aminoácidos sustancialmente como la que se define en la presente, preferentemente un dominio VH que comprenda la VH CDR3 de la SEQ ID N°: 3. La competencia entre los elementos de unión puede ser evaluada fácilmente *in vitro*, por ejemplo marcando una molécula informante específica para un elemento de unión que puede ser detectado en presencia de otro u otros elementos de unión no marcados,

para facilitar la identificación de los elementos de unión específicos que se unen al mismo epítopo o a un epítopo superpuesto. La competencia se puede determinar, por ejemplo, usando un ELISA como se describe en Carnemolla et al. (24 1996).

Como se estableciera precedentemente, los métodos para producir elementos de unión específicos acordes con la invención pueden comprender expresar un ácido nucleico codificante, y puede comprender opcionalmente el cultivo de células huésped bajo condiciones que permitan producir el elemento de unión específico. Los elementos de unión específicos y las moléculas de ácido nucleico codificante y de vectores de acuerdo con o para su uso en la presente invención se pueden proveer aisladas y/o purificadas, por ejemplo a partir de su entorno natural, en una forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácidos nucleicos o genes de un origen distinto al de la secuencia que codifica el polipéptido con la función requerida.

El ácido nucleico usado de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a la secuencia de nucleótidos definida en la presente abarca una molécula ADN de la secuencia específica y abarca una molécula de ARN de la secuencia específica en la cual U sustituye a T, a menos

que el contexto indique lo contrario.

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en diversas células huésped diferente son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en el arte para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de melanoma NSO de ratón y muchas otras. El huésped bacteriano más común y preferido es *E. coli*.

La expresión de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas, tal como *E. Coli*, está bien establecida en el arte. Por una revisión, véase, por ejemplo, Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los especialistas en el arte como una opción para producir un elemento de unión específico, véase las revisiones recientes de, por ejemplo, Ref, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.

Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, para que contengan las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras,

genes marcadores y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos, virales por ejemplo fagos, o fagémidos, según corresponda. Por detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª Edición, Sambrook et al., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hay muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo para la preparación de construcciones de ácido nucleico, de mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión genética, y análisis de proteínas, que se describen con detalle en Current Protocols in Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Las explicaciones de Sambrook et al. y Ausubel et al. se incorporan en la presente a modo de referencia.

El método para producir un elemento de unión específico de acuerdo con la invención puede comprender además la introducción de un ácido nucleico codificante en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección por fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación por cloruro de

calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

Después de la introducción se puede causar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo por cultivo de células huésped bajo condiciones que permitan la expresión del gen.

En una realización, el ácido nucleico de la invención está integrado en el genoma (por ejemplo, el cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse por inclusión de las secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

Otros aspectos y realizaciones de la presente invención serán evidentes para los especialistas en el arte a la luz de la presente explicación incluyendo los siguientes ejemplos experimentales. Los métodos de síntesis y marcación de los elementos de unión específicos de la presente invención se ilustran de manera más acabada en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se ofrecen a modo ilustrativo y no en un sentido limitativo. Todos los documentos mencionados en cualquier parte de esta memoria descriptiva se incorporan a modo de referencia.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES DE ASPECTOS Y REALIZACIONES DE LA PRESENTE INVENCION

1. Preparación y caracterización de los elementos de unión específicos de acuerdo con la presente invención

Los siguientes ejemplos emplean compuestos peptídicos

L19-SIP marcados radioactivamente.

1.1 Síntesis de I-131-L19-SIP (Método de cloramina-T)

Se colocaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) en un vial de reacción, se mezclaron con 185 MBq de [¹³¹I]NaI y se hicieron reaccionar con 30 µl de una solución recién preparada de cloramina-T (2 mg/ml) en PBS 0,2 M (pH 7,4). Después de 1 min, se agregaron 50 µl de una solución de Na₂S₂O₅ (10 mg/ml en PBS 0,2 M, pH 7,4). El L19-SIP marcado con ¹³¹I se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5% en PBS.

Rendimiento radioquímico:	45,7 %.
Pureza radioquímica:	88,3 % (SDS-PAGE).
Actividad específica:	31,7 MBq/nmol.
Inmunorreactividad:	76 %

1.2 Síntesis de I-131-L19-SIP (Método con Iodogen)

Se mezclaron 800 µg de L19-SIP en 800 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 500 MBq de [¹³¹I]NaI y se colocaron en un vial de reacción (tubo Iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó suavemente, sobre un período de 30 min a temperatura ambiente. El L19-SIP marcado con ¹³¹I se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5 % en PBS.

Rendimiento radioquímico:	93,2 %.
Pureza radioquímica:	91,1 % (SDS-PAGE).
Actividad específica:	46,6 MBq/nmol.
Inmunorreactividad:	78 %

1.3 Síntesis de 1-123-L19-SIP (método con Iodogen)

Se mezclaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 200 MBq de [¹²³I]NaI y se colocaron en un vial de reacción (tubo Iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó suavemente sobre un periodo de 30. min a temperatura ambiente. El L19-SIP marcado con ¹²³I se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5 % en PBS.

Rendimiento radioquímico:	81,6 %.
Pureza radioquímica:	89,6 % (SDS-PAGE).
Actividad específica:	61,2 MBq/nmol.
Inmunorreactividad:	84 %

1.4 Síntesis de I-124-L19-SIP (método con Iodogen)

Se mezclaron 200 µg de L19-SIP en 230 µl de PBS (PBS 0,2 M, pH 7,4) y 50 MBq de [¹²⁴I]NaI y se colocaron en un vial de reacción (tubo Iodogen, Pierce Inc.). La mezcla se agitó suavemente, sobre un periodo de 30 min a temperatura ambiente. El L19-SIP marcado con ¹²⁴I se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero

bovino 0,5 % en PBS.

Rendimiento radioquímico: 84,5 %.
Pureza radioquímica: 89,6 % (SDS-PAGE).
Actividad específica: 22.8 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 86 %

1.5 Síntesis de (3-(4-hidroxi-3-(¹³¹I)iodo-fenil) -
propionato)-L19-SIP

Se disolvieron 500 µg de (3-(4-hidroxi-fenil)-N-(sulfonato-succinimidil)propionato) en 1 ml de DMSO. Se mezclaron diez microlitros de cloramina-T (5 mg/ml en PBS) con 74 MBq de [¹³¹I]NaI, neutralizado con 15 µl de PBS (0,2 M, pH 7,4). Se agregó un microlitro de la solución de (3-(4-hidroxi-fenil)-N-(sulfonato-succinimidil)propionato) a la solución de cloramina-T/[¹³¹I]NaI y se dejó que la mezcla reaccionara durante 1 min. La reacción se detuvo por adición de 40 µl de una solución de Na₂S₂O₅ (10 mg/ml en PBS 0,2 M, pH 7,4), seguido de la adición inmediata de 200 µg de L19-SIP en 230 µl de solución amortiguadora de borato (PBS 0,2 M, pH 8,5).

El compuesto (3-(4-hidroxi-3-[¹³¹I]iodo-fenil)-propionato)-L19-SIP se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS), prebloqueada con 5 ml de albúmina de suero bovino 0,5 % en PBS.

Rendimiento radioquímico: 37,2 %.

1747
175

Pureza radioquímica: 94,6 % (SDS-PAGE).
Actividad específica: 10,3 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 69 %

1.6 Cálculos MIRD para I-131-L19-SIP

Basado en los datos de biodistribución en ratones portadores del tumor, se pudo calcular la dosis absorbida de L19-SIP marcado con I-131 utilizando la fórmula MIRD. El modelo biocinético se obtuvo con los datos ID para I-131-L19-SIP en ratones portadores del glioblastoma humano (U251). Los tiempos de residencia se calcularon como las áreas bajo la curva de funciones bi- y monoexponenciales integradas de cero a infinito incluyendo la vida media biológica y física del compuesto.

Considerando los órganos de ratón como fuente de radiación y como blanco de radiación, se pudo estimar la dosis absorbida por órgano como una autodosis (sin radiación cruzada) para I-131-L19-SIP usando los valores S del software MIRDose 3.1.

Dosis por órgano de ratón (mGy/ MBq):

Hígado	50
Riñones	160
Bazo	50
Pulmón	220
Ovarios	180-410 (dependiendo del estado del ciclo ovulatorio y de la expresión de ED-B)

Útero 600 (dependiendo del estado del ciclo
ovulatorio y de la expresión de ED-B)

Testículos 55

Sangre 130

Médula roja 50 (cálculo basado en la dosis para sangre)

Tumor 940 (calculado para un tumor de 100 mg)

Usando los tiempos de residencia calculados en el
programa MIRDOSE 3.1, se puede calcular la dosis absorbida
para humanos para I-131-L19-SIP.

Dosis por órgano en humanos (mGy/ MBq):

Adrenales	9,46E-02
Cerebro	1,64E-02
Mamas	7,33E-02
Vesícula biliar	1,00E-01
Pared LLI	4,47E-01
Intestino delgado	1,10E-01
Estómago	9,45E-02
Pared ULI	2,11E-01
Pared del corazón	6,22E-02
Riñones	1,86E-01
Hígado	7,46E-02
Pulmones	7,04E-02
Músculo	8,71E-02
Ovarios	8,07E-01
Páncreas	1,15E-01

149
177

Médula roja	9,11E-02
Superficie ósea	9,74E-02
Piel	7,20E-02
Bazo	7,11E-02
Testículos	2,38E-01
Tiroides	8,55E-02
Tiroide	8,54E-02
Pared de vejiga urinaria	7,19E-01
Útero	4,72E-01
Cuerpo completo	8,78E-02
EQUIV DOSIS EFICAZ	3,60E-01
DOSIS EFICAZ	3,21E-01

Se concluyó que la médula roja y los órganos reproductores (ovarios/útero y testículos) serían los órganos limitantes de la dosis. Sin embargo, la ventana terapéutica según los cálculos dosimétricos parecía favorable y promisorio. Se encontró una relación de dosis de tumor a dosis de médula roja de 18. Por consiguiente, I-131-L19-STP presentó una dosis notable 18 veces más alta administrada al tumor que a la médula roja.

1.7 Estudio de tratamiento de tumores después de una sola inyección i.v. de I-131-L19-SIP en ratones desnudos portadores de tumores

Se inyectó I-131-L19-SIP una vez por vía intravenosa en ratones desnudos portadores de U251 (glioblastoma) (peso

corporal de 27 g aproximadamente). Las dosis investigadas fueron de 37 MBq y 74 MBq, respectivamente. Además, se investigó un grupo de animales control (inyectados una vez con solución salina fisiológica). Durante los días después de la inyección, se determinó el tamaño del tumor (en mm²) usando un calibre.

El crecimiento de tumores U251 en ratones desnudos monitoreado después de una sola inyección intravenosa de solución salina fisiológica y de I-131-L19-SIP, respectivamente, se muestra en la figura 6.

Una sola inyección de I-131-L19-SIP a razón de 74 MBq por animal mostró un efecto pronunciado sobre el crecimiento de tumores U251 dando como resultado una estasis durante 18 días. Lo mismo se cumplió para el grupo de dosis baja (37 MBq) excepto por un ligero crecimiento del tumor que comenzó durante los últimos 5 días para el grupo de dosis baja. Por el contrario, los tumores del grupo control crecieron de forma continua durante todo el período de observación.

Los resultados de esta investigación muestran el excelente potencial de I-131-L19-SIP para el tratamiento de tumores sólidos.

1.8 Detección por imágenes de I-123-L19-SIP después de una sola inyección i.v. en ratones desnudos portadores de tumores

La sustancia de la invención se inyectó por vía

intravenosa a una dosis de 9,25 MBq aproximadamente en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (peso corporal 25 g aproximadamente). La detección por imágenes con cámara gamma se realizó a distintos tiempos después de administrar la sustancia.

La centellografía lineal de I-123-L19-SIP en Ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) 4 horas después de la inyección y 24 horas después de la inyección, permitió observar claramente el tumor. A las 4 horas después de la inyección, además de la fuerte captación en el tumor solamente se pudo detectar un ligero nivel basal en el resto del cuerpo (no unido a un órgano particular sino derivado de la sangre). En tanto se mantuvo la señal en el tumor, la señal basal en el resto del cuerpo desapareció en el tiempo. Por consiguiente, a las 24 horas de post-inyección solamente se pudo detectar al tumor.

Los resultados de esta investigación muestran el excelente potencial de I-123-L19-SIP para la detección por imágenes de tumores sólidos.

2. Ejemplos y experimentos adicionales

MATERIALES Y MÉTODOS.

Preparación y expresión de scFv, inmunoproteína pequeña (SIP) y construcciones de scFv IgG1

El scFv(L19) (Figura 1A) es un fragmento de anticuerpo madurado por afinidad ($K_d = 5,4 \times 10^{11}$ M) dirigido

específicamente contra el dominio ED-B de la fibronectina (13 Pini et al., 1998). Se usó scFv(D1.3) (7 McCafferty et al.; 26 Neri et al., 1997), una scFv lisozima anti-clara de huevo de ratón como control. Estos scFv fueron expresados en la Cepa HB2151 de E. coli (Maxim Biotech, San Francisco CA) de acuerdo con Pini et al. (34 1997).

Mini-inmunoglobulina

Para construir el gen de la inmunoproteína pequeña L19 (L19-SIP) (Figura 1C) se amplificó la secuencia de ADN que codifica scFv(L19) con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la ADN polimerasa Pwo (Roche), de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, usando los cebadores BC-618 (gtgtgcactcggaggtgcagctgttggagtctggg: SEQ ID N°: 8) y BC619 (gcctccggatttgatttccaccttggtcccttggcc: SEQ ID N°: 9), que contiene los sitios de restricción ApaLI y BspEI, respectivamente. El producto de la amplificación insertó en ApaLI/BspEI en el vector pUT- ϵ SIP, que permite obtener al gen scFv con una señal de secreción, necesaria para la secreción de proteínas hacia el medio extracelular. El vector pUT- ϵ SIP se obtuvo del vector pUT-SIP-long descrito previamente (33 Li et al., 1997) después de sustituir el dominio γ 1-CH3 constante humano por el dominio CH4 de la isoforma secretora humana IgE IgE-S2 (ϵ_{s2} -CH4; 35 Batista et al., 1996). CH4 es el dominio que permite la dimerización en la molécula de IgE y la isoforma ϵ_{s2} contiene

una cisteína por el extremo carboxilo terminal, que estabiliza al dímero IgE a través de un enlace disulfuro entre cadenas. En la molécula SIP final el ScFv(L19) se ligó con el dominio ϵ_{32} -CH4 por medio de un ligador corto GGSG. El gen SIP se recortó luego del plásmido pUT- ϵ SIP-L19 con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y se clonó en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3 (Invitrogen, Groningen, Los Países Bajos), que contiene al promotor del citomegalovirus (CMV), con el fin de obtener la construcción pcDNA3-L19-SIP.

La secuencia de ADN que codifica scFv(D1.3) se amplificó usando los cebadores BC-721 (ctcgtgcactcgcaggtgcagctgcaggagtca: SEQ ID N°: 10) y BC-732 (ctctccggaccggtttgatctcgcgcttggt: SEQ ID N°: 11) y se insertó en ApaLI/BspEI en el vector pUT- ϵ SIP. El gen D1.3-SIP se recortó luego del vector pUT- ϵ SIP-D1.3 con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI y se clonó en el pcDNA3, con el fin de obtener la construcción pcDNA3-D1.3-SIP.

Estas construcciones se usaron para transfectar células de mieloma murino SP2/0 (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.) usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) según el protocolo para células adherentes, optimizado por el proveedor. Los transfectomas se cultivaron en DMEM suplementado con FCS 10% y se seleccionaron usando geneticina 750 μ g/ml (G418,

Calbiochem, San Diego, CA).

IgG1

Para preparar *IgG1* completa, se recortó la región variable de la cadena pesada de L19 (L19-VH), junto con su secuencia del péptido de secreción, con *HindIII* y *XhoI* del L19-pUT- κ SIP descrito previamente y se insertó en el vector pUC-IgG1, que contiene al gen de la cadena pesada constante humana $\gamma 1$ completa. El gen *IgG1* recombinante se recortó luego del pUC-IgG1-L19-VH con *HindIII* y *EcoRI* y se clonó en el pcDNA3, para obtener la construcción pcDNA3-L19-IgG1.

Para preparar la cadena liviana L19 completa, se amplificó L19-VL a partir de L19-pUT- κ SIP (descrito precedentemente) por PCR usando los cebadores BC-696 (tggtgtgcactcggaaattgtgttgacgcagtc: SEQ ID N°: 12) y BC-697 (ctctcgtacgtttgatttccaccttggtcc: SEQ ID N°: 13), que contienen a los sitios de restricción *ApaLI* y *BsiWI*, respectivamente. Después de una digestión con *ApaLI* y *BsiWI*, el producto de la amplificación se insertó en el vector pUT-SEC-hC κ que contiene la secuencia de la señal de secreción y la secuencia de la cadena liviana constante κ humana. El gen recombinante de la cadena liviana se recortó luego del pUT-SEC-hC κ -L19-VL con *HindIII* y *XhoI* y se insertó en el pCMV2A, un vector de expresión de mamíferos, derivado del vector pcDNA3 por eliminación del gen de resistencia a G418, para obtener la construcción pCMV2A-L19- κ .

Se usaron cantidades equimolares de estas construcciones para cotransfectar células de mieloma murino SP210 según se describió precedentemente. Los clones seleccionados con genética fueron examinados en un ELISA por su capacidad para secretar la inmunoglobulina quimérica, completa con las cadenas pesada y liviana.

Todas las construcciones de ADN fueron purificadas usando el sistema Maxiprep de Qiagen (Hilden, Alemania) y se confirmaron las secuencias de ADN de ambas cadenas de las construcciones usando el conjunto de elementos dRhodamina Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction ABI PRISM (Perkin Elmer, Foster City, CA). Todas las enzimas de restricción (RE) eran de Roche Diagnostics (Milano, Italia), con la excepción de BsiWI (New England Biolabs, Beverly, MA). Después de la digestión con RE, los insertos y los vectores se recuperaron de geles de agarosa usando el método Qiaquick (Qiagen).

Purificación y control de calidad de los anticuerpos

Se realizó una cromatografía por inmunoafinidad para purificar los diferentes anticuerpos de acuerdo con el procedimiento descrito por Carnemolla et al. (24 1996).

Se usó ED-B conjugado con Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) según las instrucciones del proveedor (24 Carnemolla et al., 96) inmunopurificar todas las diferentes formas del anticuerpo L19, en tanto se

usó una columna de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma, St. Louis, EE.UU.) conjugado con Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) para los anticuerpos D1.3.

Las formas inmunopurificadas de los anticuerpos L19-SIP y L19-IgG1 no requirieron purificación adicional y fueron dializadas contra PBS, pH 7,4, a +4°C. Dado que los scFv obtenidos de la cromatografía por inmunoafinidad están constituidos por dos formas, monomérica y dimérica, se necesitó un segundo paso de purificación, como describieron Demartis et al. (27 2001), para aislar esta última forma. Se prepararon lotes de las diferentes formas de anticuerpo y se analizaron usando SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras, inmunohistoquímica, cromatografía por exclusión del sitio (Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech) y experimentos de ELISA.

Los experimentos de electroforesis sobre gel dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), cromatografía por exclusión de tamaño y ELISA con examen inmunohistoquímico del medio de cultivo condicionado se efectuó de acuerdo con Carnemolla et al. (24 1996). Para revelar la expresión de las diferentes formas del anticuerpo L19, se inmovilizó el fragmento recombinante 7B89 (24 Carnemolla et al., 1996), que contiene el dominio ED-B de FN, que incluye al epitope reconocido por el L19, sobre inmunoplasacas Maxisorp (Nunc,

Roskilde, Dinamarca). Para detectar los anticuerpos D1.3 en los experimentos de ELISA, se inmovilizó la lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma) sobre una superficie NH₂ de placas EIA (Costar, Cambridge, MA). Se usó una IgE anti-humana de conejo conjugada con peroxidasa (Pierre, Rockford, IL), diluida de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, como anticuerpo secundario para detectar los SIP. Se usó una IgG anti-humana de conejo conjugada con peroxidasa (Pierre) en el caso de la IgG1. Para los scFv que contienen la secuencia de marca FLAG, se usó un anticuerpo monoclonal anti FLAG humano de ratón (M2, Kodak) y un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Pierre) como anticuerpos secundarios y terciarios, respectivamente. En todos los casos, se detectó la inmunorreactividad con el antígeno inmovilizado usando el sustrato ABTS para peroxidasa (Roche) y se midió la absorbancia fotométrica a 405 nm.

Se usó una columna para cromatografía Superdex 200 (Amersham Pharmacia) para analizar los perfiles de filtración por gel de los anticuerpos purificados bajo condiciones nativas usando cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC; Amersham Pharmacia). La inmunohistoquímica para diferentes secciones de tejido congelado se efectuó según describieron Castellani et al. (22 1994) y se aplicó un gradiente de SDS-PAGE 4-18% de acuerdo con Carnemolla et

al. (17 1989) bajo condiciones reductoras y no reductoras.

Animales y líneas celulares

Se obtuvieron ratones atímicos desnudos (hembras CD1 de 8 semanas de vida nude/nude) de Harlan Italia (Correzzana, Milano. Italia), ratones de la cepa 129 (clon SvHsd) (8-10 semanas de vida, hembras) de Harlan UK (Oxon, Inglaterra). Se adquirieron células de teratocarcinoma embrionarias de ratón (F9), células derivadas de melanoma humano (SK-MEL-28) y células de mieloma de ratón (SP2/0) de American Type Culture Collection (Rockville, MD). Para inducir la formación de tumores, los ratones desnudos recibieron inyecciones por vía subcutánea de 16×10^6 células SK-MEL-28 y los ratones de la cepa 129 3×10^6 células F9. El volumen tumoral se determinó con la siguiente fórmula: $(d)^2 \times D \times 0,52$, donde d y D son, respectivamente, las dimensiones corta y larga (cm) del tumor, medidas con un calibre. El albergue, los tratamientos y el sacrificio de los animales se efectuaron de acuerdo con la legislación nacional vigente (Ley de Italia N° 116 del 27 de enero, 1992) con respecto a la protección de animales usados con fines científicos.

Radioiodación de los anticuerpos recombinantes

La radioiodación de las proteínas se realizó según el método indirecto de Chizzonite (36 Riske et al., 1991) usando tubos de iodación pre-recubiertas IODOGEN (Pierce) para activar Na^{125}I (NEN Life Science Products, Boston, MA) de

54 / 60
187

acuerdo con las recomendaciones del proveedor. En los experimentos informados, se usó 1,0 mCi de Na^{125}I para 0,5 mg de proteína. Las moléculas marcadas radioactivamente se separaron del ^{125}I libre usando columnas PD10 (Amersham Pharmacia) pre-tratadas con BSA 0,25% y equilibradas en PBS. La radioactividad de las muestras se estableció usando un contador y Crystal (Packard Instruments, Milano, Italia). El ensayo de inmunorreactividad de la proteína marcada radioactivamente se efectuó con una columna de ED-B Sepharose de 200 μl saturada con BSA 0,25% en PBS. Se aplicó una cantidad conocida de anticuerpo radioiodado, en 200 μl de BSA 0,25% en PBS, por arriba y se dejó que ingresara en la columna. A continuación, se lavó la columna con 1,5 ml de BSA 0,25% en PBS para eliminar los anticuerpos que no se unieron específicamente. Finalmente, se eluyó el material inmunorreactivo unido usando 1,5 ml de TEA 0,1 M, pH 11. Se efectuó un recuento de la radioactividad de material no unido y unido y se calculó el porcentaje de anticuerpos inmunorreactivos. La inmunorreactividad era siempre mayor que un 90%.

Para analizar aún más los anticuerpos radioiodados se cargó una cantidad conocida de proteína marcada radioactivamente en 200 μl a la columna Superdex 200. El volumen de retención de las diferentes proteínas no varió después de la radioiodación. Para las tres formas de

anticuerpo L19 radioiodadas y sus controles negativos, la recuperación de la radioactividad de la columna Superdex 200 era del 100% (Figura 3A, 3B y 3C).

Experimentos de biodistribución

Para bloquear la acumulación no específica del ^{125}I odo en el estómago y la concentración en tiroides, 30 minutos antes de inyectar los anticuerpos marcados radioactivamente, los ratones recibieron por vía oral 20 mg de perclorato de sodio (Carlo Erba, Italia) en agua. Este procedimiento se repitió a intervalos de 24h por toda la duración de los experimentos de biodistribución. Los ratones portadores del tumor recibieron inyecciones en la vena de la cola de 0,1 nmoles de los diferentes anticuerpos marcados radioactivamente (correspondiente a 6 μg de scFv, 8 μg de SIP y 18 μg de IgG) en 100 μl de salina. Se sacrificaron tres animales por tiempo, se recortaron los diferentes órganos incluyendo el tumor, se pesaron, se efectuó un recuento en un contador γ y luego se fijaron con formaldehído 5% en PBS, pH 7,4, para obtener las microautorradiografías, de acuerdo con Tarli et al. (23 1999).

También se tomaron muestras de sangre para obtener plasma para determinar la estabilidad de la molécula marcada radioactivamente en el torrente sanguíneo usando la prueba de inmunorreactividad ya descrita y el análisis de

filtración por gel. En ambos casos se usaron 200 µl de plasma. El contenido radioactivo de los diferentes órganos se expresó como el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% ID/g). Los parámetros de depuración (*clearance*) de sangre de los anticuerpos radioiodados fueron ajustados con el procedimiento de cuadrados mínimos, usando el Programa Kaleidagraph para MacIntosh (Synergy Software, Reading PA, EE.UU.) y la siguiente ecuación:

$$X(t) = A \exp(-(\alpha t)) + B \exp(-(\beta t))$$

donde $X(t)$ es el % ID/g de anticuerpo marcado radioactivamente en el tiempo t . Esta ecuación describe un perfil de depuración de sangre bi-exponencial, en el cual la amplitud de la fase alfa se define como $A \times 100 / (A + B)$ y la amplitud de la fase de eliminación beta se define como $B \times 100 / (A + B)$. Alfa y beta son parámetros de velocidad relacionados con la vida media de las fases correspondientes de depuración de sangre. $T_{1/2}(\text{fase alfa}) = \ln 2 / \alpha = 0,692... / \alpha$ $T_{1/2}(\text{fase beta}) = \ln 2 / \beta = 0,692... / \beta$. $X(0)$ era igual al 40%, correspondiente a un volumen de sangre de 2,5 ml en cada ratón.

RESULTADOS

Preparación de los anticuerpos

Se usaron las regiones variables de L19 (13 Pini et al., 1998), las diferentes formas del anticuerpo (scFv, mini-inmunoglobulina e IgG1 completa humana) y sus

rendimientos *in vivo* para el reconocimiento dirigido de la vasculatura tumoral.

En la figura 1 se muestran las construcciones utilizadas para expresar las diferentes formas del anticuerpo L19. Se prepararon construcciones similares usando las regiones variables de los scFv específicos para un antígeno no relevante (D1.3: 7 McCafferty: 26 Neri et al., 1997).

Para obtener los SIP e IgG1, se transfectaron células de mieloma SP2/0 de murinos con las construcciones que se muestran en la figura 1 y se seleccionaron los transfectomas estables usando G418. Los mejores productores fueron determinados por ELISA y estos clones fueron expandidos para la purificación del anticuerpo. La purificación de las tres formas del anticuerpo L19 se basó en la cromatografía por inmutioafinidad usando ED-B recombinante conjugado con Sepharose. Los rendimientos fueron de aproximadamente 8 mg/l para scFv(L19), 10 mg/l para L19-SIP, 3 mg/l para L19-IgG1. Como proteínas control, se usó scFv(D1.3) específico para la lisozima de huevo de gallina y, usando las regiones variables de scFv D1.3, se construyó D1.3-SIP. Estos dos anticuerpos fueron purificadas con lisozima de huevo de gallina conjugada con Sepharose. Los rendimientos fueron de 8 y 5 mg/l, respectivamente. Como control para L19-IgG1 se usó la IgG1/ κ humana disponible comercialmente (Sigma).

El análisis SDS-PAGE de las tres formas purificadas de L19 se efectuó bajo condiciones tanto reductoras como no reductoras. Para scFv(L19), la masa aparente era, según lo esperado, de 28 kDa aproximadamente bajo ambas condiciones reductoras y no reductoras (no se muestra). El L19-SIP mostró una masa molecular cercana a 80 kDa bajo, y tenía una masa de 40 kDa aproximadamente bajo condiciones reductoras. Los resultados demostraron que más del 95% de la molécula nativa existe como un dímero ligado covalentemente. El L19-IgG1 mostró, según lo esperado, una banda principal de 180 kDa aproximadamente bajo condiciones no reductoras, en tanto, bajo condiciones reductoras, mostró dos bandas correspondientes a la cadena pesada de 55 kDa aproximadamente y a la cadena liviana de 28 kDa aproximadamente. Se obtuvieron los perfiles de elución de las tres formas del anticuerpo L19 analizadas por cromatografía por exclusión de tamaño (Superdex 200). En los tres casos se detectó un solo pico con una distribución normal y que representaba más del 98%. Con una curva de calibración estándar, las masas moleculares aparentes eran de 60 kDa para scFv(L19)², 80 kDa para L19-SIP y 280 kDa para L19-IgG1. Además, se demostró la ausencia de los agregados moleculares que a menudo están presentes en las preparaciones de proteínas recombinantes y que pueden invalidar los resultados obtenidos en los estudios *in vivo*.

Se obtuvieron resultados similares con los análisis por SDS-PAGE y cromatografía por exclusión del sitio (Superdex 200) realizados con las proteínas control purificadas.

Con estas tres formas diferentes de anticuerpo L19, se efectuaron análisis inmunohistoquímicos utilizando secciones congeladas de melanoma SK-MEL-28 humano inducido en ratones desnudos y de teratocarcinoma murina F9 inducida en ratones de la cepa 129. Se obtuvieron resultados óptimos a concentraciones tan bajas como 0,25-0,5 nM. Los tres anticuerpos L19 purificados reconocieron estructuras idénticas.

Estabilidad *in vivo* de las formas del anticuerpo L19 marcado radioactivamente

Para los estudios de biodistribución *in vivo*, se utilizó melanoma SK-MEL-28 humano y teratocarcinoma F9 de murinos. El tumor SK-MEL-28 presentaba un índice de crecimiento relativamente lento en tanto el tumor F9 crece rápidamente (Figura 2). Por ello, el uso del tumor SK-MEL-28 permitió realizar experimentos de larga duración (hasta 144h), en tanto el tumor F9 era inducido para estudios de biodistribución cortos (hasta 48 h). Todos los experimentos de biodistribución se realizaron cuando los tumores medían aproximadamente 0,1-0,3 cm³. Para comparar las diversas formas de anticuerpo, se inyectaron cantidades equimolares (0,1 nmol) en 100 µl de salina estéril. Antes de la

inyección, los compuestos radioiodados pasaron por filtros de 0,22 μ m y se verificó la inmunorreactividad y el perfil de filtración por gel (véase Materiales y métodos). La inmunorreactividad de las proteínas marcadas radioactivamente siempre era de más del 90%.

En la figura 3 A-C se muestran los perfiles del análisis de la filtración por gel (Superdex 200) de las formas del anticuerpo L19 radioiodadas.

Se tomaron muestras de sangre de los animales tratados a los diferentes intervalos de tiempo desde la inyección y se analizó la radioactividad presente en el plasma por inmunorreactividad y mediante cromatografía de filtración por gel. Los perfiles de filtración por gel mostraron un solo pico principal, que tiene la masa molecular de la proteína inyectada, para las tres formas del anticuerpo L19. Solamente el perfil de scFv reveló un segundo pico con una masa molecular más alta, lo que sugiere formación de agregados (Figura 3 D-F). Aún más, se observó formación de grandes agregados de masa molecular que no eluían de la columna Superdex 200 para scFv(L19)2. De hecho, en tanto la recuperación de la columna Superdex 200 era del 90-100% de la radioactividad aplicada para ambas formas L19-SIP y L19-IgG, el rendimiento de la radioactividad cargada de scFv(L19)2 era del 55% aproximadamente. La radioactividad retenida solamente se recuperó después de lavar la columna

61 ~~157~~
194

para cromatografía con NaOH 0,5 M, lo que demuestra que los agregados grandes eran bloqueados en el filtro de columna (Tabla 1).

En la tabla 1 también se informan los resultados de la prueba de inmunorreactividad realizada con plasma (véase Materiales y métodos). Durante el transcurso de los experimentos, L19-SIP y L19-IgG1 mantuvieron la misma inmunorreactividad en plasma que los reactivos iniciales. Por el contrario, ya a las 3 horas después de la inyección la inmunorreactividad de scFv(L19)₂ en plasma se había reducido a menos de un 40%.

Experimentos de biodistribución comparativos

En las tablas 2 a, b, c y en la figura 4 se informan los resultados obtenidos en los experimentos de biodistribución con los L19 marcados radioactivamente anticuerpos en ratones portadores del tumor SK-MEL-28.

En las tablas 2 a, b, c se muestra, en diferentes tiempos desde la inyección i.v. de los anticuerpos marcados radioactivamente, el promedio ($\pm$ DE) del % ID/g de tejidos y órganos, incluyendo tumores.

En la figura 4 se representan las variaciones del % ID/g de las diferentes formas del anticuerpo en tumor (A) y sangre (B) en los diferentes tiempos de los experimentos, así como las relaciones (C) entre el % ID/g en tumor y sangre. Las tres formas del anticuerpo L19 se acumularon

selectivamente en el tumor y la relación del % ID/g de tumor y otros órganos se informan en la tabla 3.

Tal como lo demuestran las microautorradiografías, los anticuerpos solamente se acumulan sobre la vasculatura tumoral, en tanto no se observa una acumulación específica sobre la vasculatura de los órganos normales. Por el contrario, no se encontró una acumulación específica de las moléculas control radiolodadas ni en tumores o en tejidos normales (Tablas 2 a, b, c).

Las tres formas del anticuerpo L19 mostraron una depuración mediada principalmente por el riñón, determinada por recuento de muestras de orina. Según lo esperado, la velocidad de depuración era mayor para scFv(L19)₂ y menor para la L19-IgG1 completa. El ajuste de la curva con una función biexponencial permitió obtener los valores de vida media indicados en la tabla 4.

En la figura 5 se muestran las variaciones en el % ID/g ($\pm$ DE) de tumor y sangre obtenidas con scFv(L19)₂ y L19-SIP radioiodados usando el modelo de tumor de teratocarcinoma F9. Debido a la gran actividad angiogénica del teratocarcinoma F9, la acumulación de las moléculas radioactiva en este tumor era 3 a 4 veces mayor, 3 y 6 h después de la inyección i.v. que en el tumor SK-MEL-28 y era persistentemente mayor durante las 48h de duración del experimento. Con respecto al tumor SK-MEL-28, se confirmó la

acumulación específica en la vasculatura tumoral por microautorradiografía, en tanto no se observó una acumulación específica en el tumor después de la inyección de las moléculas control. En la tabla 5 se informa el % ID/g de L19(scFv) y L19SIP, en diferentes tiempos después de la inyección i.v., en tumores F9 y otros órganos.

Síntesis de L19-SIP reducido

A una solución de 375 µg (5 nmol) de L19-SIP en 422 µl de PBS se agregaron 50 µl de solución TCEP (14,34 mg de TCEP x HCl/5 ml de Na₂HPO₄ acuoso, 0,1 M, pH = 7,4). La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 1h a 37 °C. Se purificó L19-SIP reducido por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS). El análisis por SDS-PAGE del producto aislado demostró la transformación cuantitativa de L19-SIP en L19-SIP reducido.

Rendimiento: 100,3 µg/200 µl de PBS (26,7%).

Síntesis de Tc-99m-L19-SIP

Se colocaron 3,0 mg L-tartrato disódico en un vial seguido de adición de 100,3 µg de L19-SIP reducido en 200 µl de PBS y la solución se diluyó con 100 µl de solución amortiguadora acuosa de Na₂HPO₄ (1 M, pH = 10,5). Se agregaron 85 µl de eluato generador de Tc-99m (24h) y 10 µl de solución de SnCl₂ (5 mg de SnCl₂/1 ml HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h a 37 °C. El L19-SIP marcado con Tc-99m se purificó por cromatografía sobre

170
197

gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 35,6%.

Pureza radioquímica: 90,2% (SDS-PAGE).

Actividad específica: 26,4 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 91,4 %

Síntesis de carboximetil-t-butil disulfuro de Tc-99m-MAG2-L19-SIP

Se calentó una solución de 21,75 ml (0,312 mol) de ácido 1-mercaptoacético, 43,5 ml (0,312 mol) de trietilamina y 100 g (0,312 mol) de N-(ter-butiltio)-N,N'-di-BOC-hidrazina en 1 l de EtOH (abs.) bajo reflujo (atmósfera de N₂) durante 60 h. El EtOH se evaporó bajo presión reducida hasta un volumen final de 200 ml aproximadamente. El residuo se vertió en 1,8 l de H₂O y el pH de la suspensión resultante se ajustó en 7,14 usando NaOH 5 molar. La di-BOC-hidrazina se separó por filtración y el pH de la solución resultante se ajustó en 2,2 usando HCl concentrado al 50%. El material crudo se extrajo con agua 3x y 600 ml de CH₂Cl₂. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y el solvente se evaporó bajo presión reducida obteniéndose 41,1 g (80%) como un aceite amarillo. El material era suficientemente puro para una síntesis adicional.

N-(benciloxicarbonil-Gly)Gly t-butiléster (Z-N-Gly) Gly t-butiléster

Se agitó una solución de 35,02 g (114 mmol) de Z-Gly-O-

85-174
198

succinimida y 15 g (114 mmol) de Gly-O-t-Bu en 1,4 l de CH₂Cl₂ bajo atmósfera N₂ a temperatura ambiente durante 20 h. La capa orgánica se lavó 3x con 250 ml de ácido cítrico acuoso 1%, 2x con 200 ml de NaHCO₃ acuoso saturado al 50% y 1x con 200 ml de agua. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro. La evaporación de CH₂Cl₂ bajo presión reducida permitió obtener 36,5 g (99%) de Z-Gly-Gly-O-t-Bu como un aceite amarillo. El material crudo era suficientemente puro para una síntesis adicional.

Gly-Gly t-butiléster

Se disolvieron 36,5 g (113 mmol) de Z-Gly-Gly-O-t-Bu en 1 l de THF seguido de la adición de 3,65 g de paladio sobre carbón (10%). La mezcla se agitó bajo atmósfera de H₂ (1 atm) durante 3 h a temperatura ambiente. La suspensión se purgó con N₂, se filtró (filtro PTFE: 0,45 µm) y el filtrado se concentró bajo presión reducida obteniéndose 20,3 g (95%) de Gly-Gly-O-tBu como un aceite amarillo. El material crudo era suficientemente puro para una síntesis adicional.

Glicil-glicina-t-butiléster, carboximetil-t-butil disulfuro

Se agregó por gotas una solución de 23,85 g (115,6 mmol) de DCC en 430 ml de CH₂Cl₂ a una solución de 21,76 g (115,6 mmol) de Gly-Gly-O-t-Bu, 20,84 g (115,6 mmol) de carboximetil-t-butil disulfuro y 13,3 g (115,6 mmol) de NHS en 1 l de CH₂Cl₂. La suspensión resultante se agitó durante

la noche bajo atmósfera de N_2 a temperatura ambiente. después de la filtración la solución resultante se lavó 3x con 400 ml de $NaHCO_3$ acuoso saturado al 50% y 1x con 400 ml de agua. La capa orgánica seca ($MgSO_4$) se evaporó bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de solventes que variaba de $CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1 a $CH_2Cl_2/MeOH$ 98,5:1,5. Se aislaron 26,1 g (64%) como un aceite amarillo.

Meraptoacetil-glicil-glicina

Se disolvieron 26,32 g (75,09 mmol) de glicil-glicina-t-butiléster carboximetil-t-butil disulfuro en 233 ml de TFA bajo atmósfera de N_2 . La solución resultante se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. El TFA se evaporó bajo presión reducida ($5-10 \times 10^{-2}$ mbar) y el aceite resultante se secó bajo agitación durante otras 2 h ($5-10 \times 10^{-2}$ mbar). Después de la adición de 250 ml de Et_2O precipitó un polvo blanco y la suspensión se agitó durante 3 h. El material se separó por filtración y se resuspendió en 100 ml de Et_2O . La suspensión resultante se agitó durante la noche, el producto se separó por filtración y el material se secó a temperatura ambiente bajo presión reducida obteniéndose 20,46 g (92,5%) como un polvo blanco.

NHS éster de meraptoacetil-glicil-glicina

Se combinó meraptoacetil-glicil-glicina (1 g, 3,4 mmol) con N-hidroxisuccinimida (391 mg, 3,4 mmol) en un

balón seco y se disolvieron en DMF anhidro (4 ml). Se agregó DCC (700 mg, 3,4 mmol) en dioxano anhidro (2 ml) con la mezcla de reacción bajo agitación. Dentro de los 15 min comienza a formarse un precipitado (DCU). Después de 1 h el precipitado se separa por filtración bajo vacío. El precipitado se lavó con dioxano frío. El dioxano se separó del filtrado. El producto se precipitó de la solución remanente de DMF por adición de dietiléter. El producto se aisló por filtración, se lavó con dietiléter frío y se secó en un desecador de vacío durante la noche. Rendimiento: 1,33 (99 %).

Síntesis de Tc-99m-MAG2-ε-HN(Lys)-L19-SIP

Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 111 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializó 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de fosfato (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de NHS éster de mercaptoacetil-glicil-glicina (0,50 mg disueltos en 500 µl de solución amortiguadora de fosfato, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de fosfato (0,1 M, pH 8,5) por vez, emplean el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 3,0

174
201

mg de L-tartrato disódico al vial seguido de adición de 90 μ l de eluato generador Tc-99m (eluido diariamente) y se agregaron 25 μ l de solución de SnCl_2 (5 mg de SnCl_2 /1 ml de HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h a 37 °C. El L19-SIP marcado con Tc-99m se purificó mediante cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico:	55,1 %.
Pureza radioquímica:	94,5 % (SDS-PAGE).
Actividad específica:	15,2 MBq/nmol.
Inmunorreactividad:	81,1 %

Síntesis de Re-188-L19-SIP

Se colocaron 3,0 mg de L-tartrato disódico en un vial seguido de adición de 150 μ g de L19-SIP reducido-SH en 310 μ l de PBS y la solución se diluyó con 100 μ l de solución amortiguadora acuosa de Na_2HPO_4 (1 M, pH = 10,5). Se agregaron 100 μ l de eluato generador de Re-188 y 50 μ l de solución de SnCl_2 (5 mg de SnCl_2 /1 ml de HCl 0,1 M). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a 37°C. El L19-SIP marcado con Re-188 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico:	34,8 %.
Pureza radioquímica:	97,2 % (SDS-PAGE).
Actividad específica:	13,5 MBq/nmol.
Inmunorreactividad:	91,7 %

Síntesis de L19-SIP reducido para una conjugación específica de EDTA, CDTA, TETA, DTPA, TTHA, HBED, DOTA, NOTA, DO3A y quelantes semejantes con el grupo cisteína-SH

Se agregaron 50 µl de solución de TCEP (14,34 mg TCEP x HCl/5 ml de Na₂HPO₄ acuoso, 0,1 M, pH = 7,4) a una solución de 375 µg (5 nmol) de L19-SIP en 422 µl de PBS. La mezcla de reacción se agitó suavemente durante 1 h a 37 °C. El L19-SIP reducido se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: solución amortiguadora de acetato de sodio, 0,1 M, pH 5,0). El análisis por SDS-PAGE del producto aislado demostró la transformación cuantitativa de L19-SIP en L19-SIP reducido. Rendimiento: 105,7 µg/200 µl (28,2 %).

*Síntesis de In-111-MX-DTPA-maleimida-S(Cys)-L19-SIP-R
(R = reducido)*

Se hicieron reaccionar 105 µg (2,8 nmol) de L19-SIP reducido en 200 µl de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 5) con 50 µl de 1,4,7-triaza-2-(N-maleimido etilen-p-amino)bencil-1,7-bi(carboximetil)-4-carboximetil-6-metil-heptano disuelto (0,25 mg de DTPA-maleimida en 500 µl de solución amortiguadora de acetato de sodio, 0,1 M, pH 5) durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 80 µl de solución de [In-111]InCl₃ (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min.

El DTPA-maleimida-S(Cys)-L19-SIP marcado con In-111 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 51,6 %.
Pureza radioquímica: 97,2 % (SDS-PAGE).
Actividad específica: 7,9 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 88,5 %

Síntesis de MX-DTPA-maleimida (1,4,7-triaza-2-(N-maleimido-etilen-p-amino)bencil-1,7-bis (carboximetil)-4-carboximetil-6-metil-heptano)

Se disolvieron 512 mg (1 mmol) de ácido {[3-(4-amino-fenil)-2-(bi-carboximetilamino)-propil]-[2-(bi-carboximetil-amino)-propil]}-aminoacético (Macrocyclics Inc. Dallas, TX, EE.UU.) y 707 mg (7 mmol) de trietilamina en 3 ml DMF seco. Se agregaron, por gotas, 400 mg (1,5 mmol) de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster del ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-propiónico (Aldrich) en 1 ml de DMF seco. La solución se agitó durante 5 h a 50 °C. Se agregaron, lentamente, 30 ml de dietiléter. La mezcla de reacción se agitó durante otros 30 min. El precipitado se recolectó por filtración. El producto crudo se purificó mediante RP-HPLC (acetonitrilo:agua:ácido trifluoracético; 3:96,9:0,1 ->

99,9:0:0,1). Rendimiento: 61% (405 mg, 0,61 mmol). MS-ESI: 664 = M⁺ +1.

Síntesis de In-111-MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP

Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 111 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de 1,4,7-triaza-2-(p-isotiocianato)bencil-1,7-bis(carboximetil)-4-carboximetil-6-metil-heptano (MX-DTPA) (0,33 mg de MX-DTPA disuelto en 500 µl de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 80 µl de solución de [In-111]InCl₃ (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37°C durante 30 min. El MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con In-111 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 72,4 %.

Pureza radioquímica: 80,3 % (SDS-PAGE).

205

Actividad específica: 8,8 MBq/nmol.

Inmunorreactividad: 77,5 %

Síntesis de In-111-DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP

Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 108 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de ácido 1,4,7,10-tetra-aza-2-(p-isotiocianato)bencil-ciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (bencil-p-SCN-DOTA, Macrocyclics Inc., Dallas TX, EE.UU.) (1,5 mg de bencil-p-SCN-DOTA disuelto en 5 ml de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) a la solución y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 80 µl de solución de [In-111]InCl₃ (HCl, 1 N, 40 MBq, Amersham Inc.) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 30 min. El DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con In-111 se purificó por cromatografía

sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico: 70,8 %.
Pureza radioquímica: 92,1 % (SDS-PAGE).
Actividad específica: 10,1 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 75,1 %

Síntesis de Y-88-MX-DTPA-ε-IN(Lys)-L19-SIP

Se diluyeron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 110 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de MX-DTPA (0,33 mg de MXDTPA disuelto en 500 µl de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 100 µl de solución de [Y-88]YCl₃ (HCl, 1 N, 75 MBq, Oak Ridge National Lab.) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 30 min. El MX-DTPA-ε-HN(Lys)-L19-SIP marcado con Y-88 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5 (Amersham, Eluyente: PBS).

179
207

Rendimiento radioquímico: 68,1 %
Pureza radioquímica: 91,5 % (SDS-PAGE).
Actividad específica: 11,4 MBq/nmol.
Inmunorreactividad: 70,5 %

Síntesis de Lu-177-DOTA-C-bencil-p-NCS -ε-HN(Lys)-Z19-SIP

Se disolvieron 200 µg (2,66 nmol) de L19-SIP no reducido en 120 µl de PBS con 300 µl de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) y se dializaron 2 x 1 h con 200 ml de solución amortiguadora de borato de sodio (0,1 M, pH 8,5) empleando un equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Se agregaron 50 µl de solución de bencil-p-SCN-DOTA (1,5 mg disueltos en 5 ml de solución amortiguadora de borato de sodio, 0,1 M, pH 8,5) y la mezcla de reacción se calentó durante 3 h a 37°C. La mezcla de reacción se dializó 2 x 1 h y 1 x 17 h (durante la noche) con 200 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio (0,1 M, pH 6,0) por vez, empleando el equipo Slide-A-Lyzer 10.000 MWCO (Pierce Inc., Rockford, IL, EE.UU.).

Se agregaron 200 µl de solución de [Lu-177]LuCl₃ (HCl, 1 N, 80 MBq, NRH-Petten, Los Países Bajos) y la mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 30 min. El DOTA-C-bencil-p-NCS-ε-HN(Lys)L19-SIP marcado con Lu-177 se purificó por cromatografía sobre gel usando una columna NAP-5

(Amersham, Eluyente: PBS).

Rendimiento radioquímico:	72,2 %.
Pureza radioquímica:	94,9 % (SDS-PAGE).
Actividad específica:	18,3 MBq/nmol.
Inmunorreactividad:	73,4 %

Distribución en órganos y excreción de In-111-PU-DTPA-LI9-SIP después de una sola inyección i.v. en ratones desnudos portadores de tumores

Los péptidos marcados de la invención fueron inyectados por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 37 kBq en animales portadores de F9 (teratocarcinoma) (peso corporal de 25 g aproximadamente). Se midió la concentración de radioactividad en diversos órganos y la radioactividad excretada usando un contador y en diversos tiempos después de administrar la sustancia.

La biodistribución de In-111-MX-DTPA-LI9-SIP en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (media $\pm$ DE, n = 3) se muestra en la tabla 6.

Distribución en órganos y excreción de Tc-99m-LI9-SIP después de una sola inyección i.v. en ratones desnudos portadores de tumores

Los péptidos marcados fueron inyectados por vía intravenosa a una dosis de 56 kBq aproximadamente en animales portadores de F9 (teratocarcinoma) (peso corporal de 25 g aproximadamente). Se midió la concentración de

radioactividad en diversos órganos y la radioactividad excretada usando un contador y en diversos tiempos después de administrar la sustancia. Además, se determinó la relación de tumor a sangre en diversos tiempos basado en la concentración del péptido en tumor y sangre.

La biodistribución de Tc-99m-L19-SIP en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (media $\pm$ DE, n = 3) se muestra en la tabla 7.

La relación de tumor a sangre de Tc-99m-L19-SIP en ratones desnudos portadores de F9 (teratocarcinoma) (media $\pm$ DE, n = 3) se muestra en la tabla 8.

Los péptidos marcados radioactivamente demostraron que tienen propiedades favorables en los experimentos con animales. Por ejemplo, el DTPA-s-HN(Lys)-L19-SIP marcado con Tc-99m-L19-SIP y In-111-MX presentó una gran acumulación en tumores de % dosis inyectada por gramo (ID/g) 1 hora después de la inyección (p.i.) del 17,2 (Tc-99m) o 12,9 (In-111). Se observó una retención significativa en el tumor del 9,4 (Tc-99m) o 13,0 (In-111) % ID/g a las 24 horas p.i.. Por consiguiente, la captación en tumor es significativamente mayor en comparación con otros fragmentos de anticuerpo conocidos marcados con In-111 o Tc-99m (por ejemplo Kobayashi et al., J. Nuc. Med., Vol. 41(4), págs. 755-762, 2000; Verhaar et al., J. Nuc. Med., Vol. 37(5), págs. 868-872, 1996). La depuración de sangre del compuesto condujo a

relaciones de tumor/sangre de 13:1 y 6:1, respectivamente, a las 24 h p.i.

Más notable aún, el In-111-MX-DTPA-s-HN(Lys)-L19-SIP mostró una captación y retención significativamente menor en riñón (22,5 % ID/g) que otros fragmentos de anticuerpo recombinante marcados con In-111 altamente retenidos (120 % ID/g) como se describe por ejemplo en Kobayashi et al. a las 24 h de p.i. La retención en riñón es un problema muy común y habitualmente dificulta el uso de compuestos marcados con lantánidos en las radioterapias.

Los resultados experimentales demuestran el excelente potencial de los radioinmunoconjugados que se describen en la presente para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, preferentemente aplicadas al paciente mediante una administración parenteral.

DISCUSIÓN

La observación que las drogas anticancerosas citotóxicas se localizan más eficazmente en tejidos normales que en los tumores (37 Bosslet et al., 1998) desencadenó una oleada de estudios que investigaban la posibilidad de un suministro de drogas selectivo a los tumores. Sin embargo, un reconocimiento dirigido eficaz de tumores tiene dos requisitos principales: 1) un blanco en el tumor que sea específico, abundante, estable y fácilmente disponible para las moléculas de ligando que provienen del torrente

sanguíneo y 2) una molécula de ligando con propiedades farmacocinéticas adecuadas que difunda fácilmente desde el torrente sanguíneo hacia el tumor y que tenga una gran afinidad por el blanco para asegurar una acumulación eficaz y selectiva en el tumor.

Debido a sus características distintivas, el microambiente tumoral es un posible blanco que incluye a todos los tumoral. De hecho, el avance del tumor induce (y posteriormente necesita) modificaciones significativas en los componentes del microambiente tumoral, en particular en los de la matriz extracelular (ECM). Las moléculas que conforman la ECM de los tumores sólidos difieren tanto cuantitativamente como cualitativamente de las de la ECM normal. Más aún, muchos de estos componentes de la ECM del tumor son compartidos por todos los tumores sólidos, que explica las propiedades y funciones generales tales como invasión celular (tanto de células normales en tejidos tumorales como de células cancerosas en tejidos normales) y angiogénesis. Entre las numerosas moléculas que constituyen la ECM tumoral modificada, los inventores de la presente han centrado su atención en una isoforma de FN que contiene al dominio ED-B (B-FN).

El dominio B-FN se expresa ampliamente en la ECM de todos los tumores sólidos evaluados hasta el momento y constantemente se asocia con los procesos angiogénicos (22

Castellani et al., 1994), pero por lo demás no es detectable en los tejidos adultos normales (17 Carnemolla et al., 1989). El direccionamiento de agentes terapéuticos hacia la ECM subendotelial supera los problemas asociados con la hipertensión intersticial de los tumores sólidos (38 Jain et al. 1988; 39 Jain, 1997; 40 Jain RK, 1999).

El L19 (13 Pini et al. 1998; 25 Viti, Canc. Res., 23 Tarli, et al., 1999), un scFv con una gran afinidad ($K_d = 5,4 \times 10^{-11}$ M) por el dominio ED-B de FN, se acumula selectiva y eficazmente *in vivo* alrededor de la neovasculatura tumoral y puede transportar y concentrar selectivamente en la masa tumoral cualquiera de numerosas moléculas terapéuticas con las cuales está conjugado (28 Birchler et al., 1999; 29 Nilsson, et al., 2001; 30 Halin et al., 2002; 31 Carnemolla et al., 2002). También se ha demostrado en pacientes la capacidad de L19 para reconocer selectivamente a los tumores usando técnicas centellográficas.

En la presente memoria descriptiva se describe la marcación de una inmunoproteína pequeña (SIP) con radioisótopos, sobre el uso de la SIP marcada radioactivamente y sobre el rendimiento del reconocimiento dirigido de la vasculatura de tumores y la farmacocinética de tres formas diferentes del anticuerpo L19 humano: el scFv, la mini-inmunoglobulina/inmunoproteína pequeña y la

IgG1 completa humana.

La molécula SIP se obtuvo por fusión del scFv(L19) con el dominio sCH4 de la isoforma secretora S₂ de la IgE humana. El sCH₄ es el dominio que permite la dimerización de las moléculas de IgE y la isoforma S₂ contiene una cisteína por el extremo COOH terminal que estabiliza covalentemente el dímero a través de un enlace disulfuro intercatenaria (35 Batista et al., 1996). Los sitios de unión de IgE para FcεRI residen en el dominio CH3 (41 Turner y Kinet, 1999; 42 Vangelista et al., 1999; 43 Garman et al., 2000), entonces el scFv fusionado al dominio sCH4 de acuerdo con realizaciones de la presente invención no activa todo el señalamiento que conduce a reacciones de hipersensibilidad.

Se estudió el rendimiento de estas tres formas en dos modelos diferentes de tumores en ratón: en teratocarcinoma F9 de murino y en melanoma SK-MEL-28 humano. El primero es un tumor de crecimiento rápido que, una vez implantado, mata a los animales en dos semanas aproximadamente. Por otro lado, el tumor SK-MEL-28 presenta una curva de crecimiento bifásica, con una fase de crecimiento rápido temprano seguido de una segunda fase más lenta. Se ha demostrado previamente que la cantidad de ED-B en el teratocarcinoma F9 permanece estable durante el crecimiento del tumor (23 Tarli, et al., 1999); por el contrario, el ED-B se acumula en el melanoma SK-MEL-28 proporcionalmente a la capacidad

del tumor para crecer (23 Tarli et al., 1999), con abundante ED-B en la primera fase y una menor cantidad en la segunda. El uso del tumor de melanoma SK-MEL-28 permitió llevar a cabo estudios a largo plazo sobre la biodistribución sin variaciones dramáticas de la masa tumoral (Figura 2) que podría dar lugar a una interpretación errónea de los resultados.

Los estudios comparativos de las tres formas del anticuerpo L19 en términos de estabilidad *in vivo* mostraron que L19-SIP y L19-IgG1 mantuvieron, durante toda la duración de los experimentos (144 h), la misma inmunorreactividad y masa molecular en plasma que antes de la inyección. Por el contrario, el scFv(L19) perdió rápidamente su inmunorreactividad en plasma y generó agregados que eran demasiado grandes como para ingresar en la columna de cromatografía para filtración por gel. Es muy probable que dicha agregación del scFv sea responsable de la relación entre el % ID/g del tumor y pulmón, dado que los agregados podrían acumularse en la microvasculatura del pulmón (Tabla 3). Para los tres formatos, la depuración de sangre tiene lugar principalmente por el riñón, mostrando una curva bifásica con una fase α y una fase β , como se muestra en la tabla 4, que es inversamente proporcional al tamaño molecular.

La acumulación de las diferentes formas del anticuerpo

en los tumores estudiados era consecuencia de la velocidad de depuración y la estabilidad *in vivo* de las moléculas. Con el scFv, el porcentaje máximo de dosis inyectada por gramo (% ID/g) se observó 3h después de la inyección del anticuerpo marcado radioactivamente y luego disminuyó rápidamente. Con el SIP, el % ID/g en los tumores era 2-5 veces más alto que el de scFv, alcanzando un máximo 4-6 horas después de la inyección. Este patrón se observó en ambos tumores F9 y SK-MEL-28. Por el contrario, la acumulación de IgG1 en tumores aumentó de forma constante durante los experimentos. Sin embargo, debido a su depuración lenta, la relación de tumor-sangre para % ID/g después de 144 horas sólo era de 3 aproximadamente, en comparación con una relación de 10 para el scFv y 70 para el SIP después del mismo período de tiempo (Figura 4).

Estas mismas propiedades distintivas de estabilidad, depuración y rendimiento del reconocimiento dirigido de tumores *in vivo* que emplea las tres formas del anticuerpo estudiadas aquí se pueden aprovechar para diferentes fines de diagnóstico y/o terapéuticos, dependiendo de las necesidades clínicas y de la enfermedad. Por ejemplo, los anticuerpos marcados radioactivamente que muestran buenas relaciones de tumor-órgano y tumor-sangre rápidamente después de la inyección son los que se necesitan para un diagnóstico por inmunocentellografía *in vivo*, principalmente

porque se usan isótopos de vida media corta en dichos análisis.

Hay diferentes enfoques posibles con el uso de anticuerpos como vehículo para agentes terapéuticos: el suministro de sustancias que ejercen sus efectos terapéuticos después de alcanzar el blanco (por ejemplo, fotosensibilizadores activados solamente sobre los blancos), para las cuales la cantidad absoluta suministrada al tumor es relevante; el suministro de sustancias que ejercen sus efectos terapéuticos y tóxicos aún antes de alcanzar el blanco (por ejemplo, el emisor β itrio90), para las cuales se debe prestar particular atención con la relación al área bajo la curva de la acumulación en tumor y sangre en función del tiempo, con el fin de minimizar la toxicidad sistémica y para maximizar el efecto terapéutico anti-tumoral.

Por ejemplo, el L19-SIP parece ofrecer el mejor compromiso entre estabilidad molecular, velocidad de depuración y acumulación en el tumor. Ya sea han descrito proteínas de fusión similares compuestas de fragmentos de anticuerpo scFv unidos a un dominio dimerizante (44 Hu et al, 1996; 33 Li et al., 1997), pero en ambos casos se usó el γ 1CH3 humano como dominio dimerizante. El uso del dominio κ 2CH4 humano provee una manera sencilla de lograr una estabilización covalente del dímero. Además, se puede reducir fácilmente el puente disulfuro formado por los

residuos cisteína C-terminales bajo condiciones suficientemente suaves como para preservar la estructura general de la molécula, proporcionando así un grupo reactivo fácilmente accesible para una marcación radioactiva o una conjugación química. Esta característica parece particularmente promisorio en vista del potencial clínico.

El L19-IgG1 se acumula abundantemente en los tumores y aún cuando esta acumulación es desplazado por una velocidad de depuración lenta de la sangre, se puede usar el procedimiento de tres pasos para eliminar los anticuerpos en circulación para permitir su uso no sólo con fines terapéuticos sino también en la inmunocentellografía de diagnóstico (45 Magnani et al. 2000) .

REFERENCIAS

1. Shawler et al. J. Immunol., 135: 1530-1535, 1985
2. Miller et al. Blood, 62: 988-995, 1983.
3. Hakimi et al. J. Immunol., 147: 1352-1359, 1991.
4. Stephens et al. Immunology, 85: 668-674, 1995.
5. Riechmann et al. Nature, 332: 323-327, 1988.
6. Junghans et al. Cancer Res., 50: 1495-1502, 1990.
7. McCafferty et al. Nature, 348: 552-554, 1990.
8. Zowman et al. Biochemistry, 30: 10832-10838, 1991
9. Nilsson et al. Advanced Drug Delivery Reviews, 43: 165-196, 2000.
10. Winter et al. Annu. Rev. Immunol., 12: 433-455,

85 ~~192~~
218

1994.

11. Reichert. Nature Biotech., 19: 819-822, 2001.

12. Huls et al. Nature Biotech., 17: 276-281, 1999,

13. Pini et al. J Biol Chem, 273: 21769-21776, 1998.

14. Neri y Zardi. Advanced Drug Delivery Reviews, 31: 43-52, 1998.

15. Bissel y Radisky. Nature Reviews - Cancer., 1: 46-54, 2001.

16. Balza et al. FEBS Lett., 228: 42-44, 1988.

17. Carnemolla et al. J. Cell. Biol., 108: 1139-1148, 1989.

18. Borsi et al. FEBS Lett., 261: 175-178, 1990

19. Borsi et al. J. Biol. Chem., 270: 6243-6245, 1995.

20. Zardi et al. EMBO J., 6: 2337-2342, 1987.

21. ffrench-Constant et al. J. Cell Biol., 109: 903-914, 1989.

22. Castellani et al. Int J Cancer, 59: 612-618, 1994

23. Tarli et al. Blood, 94:192-198, 1999.

24. Carnemolla et al. Int J Cancer, 68: 397-405, 1996

25. Viti et al. Cancer Res, 59: 347-353, 1999.

26. Neri et al. Nature Biotechnol, 15: 1271-1275, 1997.

27. Demartis et al. Eur J Nucl Med, 28: 4534-4539,

2001.

28. Birchler et al. Nat Biotechnol, 17: 984-988, 1999

29. Nilsson et al. Cancer Res., 61: 711-716, 2001.

30. Halin et al. Nature Biotechnol. En prensa, 2002.
31. Carnemolla et al. Blood, 99 :, 2002
32. Wu et al. Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU., 97: 8495-8500, 2000.
33. Li et al. Protein Engineering, 10: 731-736, 1997
34. Pini et al. J. Immunol. Methods, 206: 171-183, 1997.
35. Batista et al. J. Exp. Med., 184: 2197-205, 1996.
36. Riske et al. J. Biol. Chem., 266: 11245-11251, 1991.
37. Bosslet et al. Cancer Res., 58:1195-1201, 1998.
38. Jain y Baxter. Cancer Res., 48: 7022-7032, 1988.
39. Jain. Vascular and interstitial physiology of tumors. Role in cancer detection and treatment. En: R. Bicknell, C.E. Lewis y N. Ferrara (eds). Tumour Angiogenesis, págs. 4559. Nueva York: Oxford University Press, 1997.
40. Jain. Annu. Rev. Biomed. Eng., 1: 241-263, 1999.
41. Turner y Kinet. Nature, 402 Supl., B24-B30, 1999.
42. Vangelista et al. Jour. Clin. Invest., 103:1571-1578, 1999.
43. Garman et al., Nature, 406: 259-266, 2000.
44. Hu et al. Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996.
45. Magnani et al. Br. J. Cancer, 82: 616-620, 2000.

220

Tabla 1 Inmunorreactividad (I*) y recuperación de la radioactividad (R) de Superdex 200 para los anticuerpos marcados radioactivamente, en diferentes tiempos después de la inyección i v

Tiempo	3		6		24		48		72		144	
(h)												
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
L19(scFv)	36	54	32	58	27	nd	14	nd	9	nd	4	nd
L19SIP	100	100	100	96	100	94	95	96	100	nd	95	nd
L19IgG1	100	100	100	100	95	100	100	100	100	100	95	100

Los valores de inmunorreactividad (%) y recuperación de la radioactividad (%) de Superdex 200 se determinaron en plasma como se describe en *Materiales y métodos*

* Para normalizar los valores, los resultados de la prueba de inmunorreactividad se refieren a los valores porcentuales de la inmunorreactividad antes de la inyección i v

nd no determinado

149

221

Tabla 2a Experimentos de biodistribución de fragmentos de anticuerpo D1 3 y L19 marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28

L19(scFv)		3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR		2,47 ± 0,65	2,01 ± 0,72	1,62 ± 0,43	0,95 ± 0,14	0,68 ± 0,04	0,32 ± 0,14
Sangre		1,45 ± 0,58	0,54 ± 0,12	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Hígado		0,48 ± 0,20	0,18 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Bazo		0,67 ± 0,28	0,27 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Riñón		4,36 ± 0,32	1,67 ± 0,08	0,16 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,00
Intestino		0,77 ± 0,21	0,57 ± 0,05	0,24 ± 0,06	0,17 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,09 ± 0,01
Corazón		0,77 ± 0,20	0,31 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Pulmón		2,86 ± 0,34	1,50 ± 0,67	1,07 ± 0,42	0,73 ± 0,39	0,55 ± 0,11	0,51 ± 0,22

D1 3(scFv)		3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR		1,03 ± 0,74	0,87 ± 0,42	0,15 ± 0,10	0,07 ± 0,02	nd	nd
Sangre		1,52 ± 0,86	0,81 ± 0,13	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	nd	nd
Hígado		1,19 ± 0,65	0,66 ± 0,26	0,14 ± 0,04	0,03 ± 0,08	nd	nd
Bazo		1,05 ± 0,88	0,42 ± 0,33	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	nd	nd
Riñón		3,01 ± 2,48	1,83 ± 0,76	0,48 ± 0,01	0,18 ± 0,05	nd	nd
Intestino		0,56 ± 0,54	0,56 ± 0,13	0,17 ± 0,03	0,02 ± 0,01	nd	nd
Corazón		0,86 ± 0,54	0,55 ± 0,84	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	nd	nd
Pulmón		1,28 ± 0,65	1,06 ± 0,88	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	nd	nd

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g)± DE

nd no determinado

199

122

Tabla 2b Experimentos de biodistribucion de L19-SIP y D1 3-SIP marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28

L19SIP							
	3h	6h	24h	48h	72h	144h	
TUMOR	5,23 ± 0,65	6,14 ± 2,23	4,20 ± 2,47	2,57 ± 0,31	2,33 ± 0,90	1,49 ± 0,65	
Sangre	9,82 ± 0,68	5,03 ± 0,52	1,39 ± 0,06	0,29 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,01	
Hígado	2,65 ± 0,14	1,74 ± 0,31	0,50 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,05 ± 0,01	
Bazo	3,76 ± 0,36	2,43 ± 0,24	0,71 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,18	
Riñón	7,33 ± 0,91	3,87 ± 0,21	1,09 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,01	
Intestino	1,45 ± 0,24	1,44 ± 0,29	1,06 ± 0,43	0,56 ± 0,08	0,40 ± 0,08	0,18 ± 0,00	
Corazón	4,16 ± 0,30	2,15 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	
Pulmón	7,72 ± 0,60	5,41 ± 0,55	1,81 ± 0,40	0,59 ± 0,29	0,19 ± 0,03	0,05 ± 0,01	

D1 3SIP							
	3h	6h	24h	48h	72h	144h	
TUMOR	3,80 ± 0,30	1,65 ± 0,12	0,70 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,03	
Sangre	10,40 ± 0,81	4,45 ± 0,14	1,21 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,02	
Hígado	4,05 ± 0,98	2,73 ± 0,33	1,43 ± 0,07	0,51 ± 0,21	0,15 ± 0,08	0,02 ± 0,01	
Bazo	3,31 ± 0,66	1,76 ± 0,50	0,82 ± 0,12	0,46 ± 0,20	0,15 ± 0,05	0,04 ± 0,02	
Riñón	8,41 ± 0,49	4,64 ± 0,06	1,47 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,06 ± 0,01	
Intestino	2,03 ± 0,55	1,06 ± 0,20	1,02 ± 0,06	0,14 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,04	
Corazón	3,28 ± 0,20	1,81 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	
Pulmón	6,16 ± 0,28	4,52 ± 0,07	1,16 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g)± DE
nd no determinado

124

223

Tabla 2c Experimentos de biodistribución de L19IgG1 y hIgG1k marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28

L19 IgG1		3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR		4,46 ± 0,08	5,39 ± 1,01	6,70 ± 2,10	7,80 ± 2,51	8,90 ± 2,52	11,22 ± 3,19
Sangre		16,04 ± 0,81	12,02 ± 1,65	8,31 ± 1,77	5,12 ± 1,42	5,02 ± 3,81	4,87 ± 0,26
Hígado		6,03 ± 0,37	6,77 ± 0,53	2,41 ± 0,35	1,45 ± 0,41	1,26 ± 0,71	1,09 ± 0,16
Bazo		6,63 ± 1,34	6,37 ± 1,37	2,51 ± 0,47	2,01 ± 0,32	1,80 ± 1,02	1,51 ± 0,29
Riñón		6,47 ± 0,39	5,12 ± 0,47	3,07 ± 0,35	1,73 ± 0,63	1,54 ± 1,14	1,12 ± 0,44
Intestino		1,60 ± 0,39	1,35 ± 0,65	1,43 ± 0,19	1,13 ± 0,32	1,13 ± 0,98	0,97 ± 0,47
Corazón		5,63 ± 0,67	4,77 ± 0,52	2,87 ± 0,45	1,48 ± 0,51	1,32 ± 1,09	0,92 ± 0,37
Pulmón		6,55 ± 0,65	5,15 ± 0,62	4,16 ± 0,66	2,28 ± 0,80	1,98 ± 1,60	1,42 ± 0,45

hIgG1k		3h	6h	24h	48h	72h	144h
TUMOR		nd	3,28 ± 0,38	4,00 ± 0,22	2,78 ± 0,20	nd	2,32 ± 0,26
Sangre		nd	10,12 ± 0,35	7,87 ± 0,25	6,24 ± 0,34	nd	5,41 ± 0,51
Hígado		nd	4,02 ± 0,09	2,06 ± 0,10	1,90 ± 0,24	nd	1,28 ± 0,03
Bazo		nd	4,47 ± 0,28	1,82 ± 0,01	1,42 ± 0,19	nd	1,24 ± 0,03
Riñón		nd	5,40 ± 0,19	2,56 ± 0,06	2,08 ± 0,22	nd	1,30 ± 0,15
Intestino		nd	0,72 ± 0,07	0,46 ± 0,05	0,36 ± 0,03	nd	0,31 ± 0,01
Corazón		nd	3,80 ± 0,15	2,52 ± 0,21	0,99 ± 0,18	nd	1,48 ± 0,13
Pulmón		nd	4,82 ± 0,92	3,64 ± 0,08	1,75 ± 0,32	nd	1,09 ± 0,13

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g)± DE

nd no determinado

223

224

Tabla 3 Relaciones de tumor-órgano del % ID/g de las formas del anticuerpo L19 marcado radioactivamente en ratones portadores del tumor SK-MEL-28

	L19(ScFv)						L19-SIP						L19 IgG1					
Tiempo(h)	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144	3	6	24	48	72	144
TUMOR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sangre	1,7	3,7	16,2	23,7	22,7	10,7	0,5	1,2	3,0	8,9	29,1	74,5	0,3	0,4	0,8	1,5	1,8	2,3
Hígado	5,1	11,1	40,5	47,5	34,0	16,0	2,0	3,5	8,4	13,5	23,3	29,8	0,7	0,8	2,8	5,4	7,1	6,3
Bazo	3,7	7,4	23,1	31,6	34,0	16,0	1,4	2,5	5,9	10,0	17,9	8,8	0,7	0,6	2,7	3,9	4,9	7,4
Riñón	0,6	1,2	10,1	15,8	17,0	10,7	0,7	1,6	3,8	8,6	16,6	29,8	0,7	1,0	2,2	4,5	5,8	5,3
Intestino	3,2	3,5	6,7	5,6	5,7	3,6	3,6	4,3	4,0	4,6	5,8	8,3	2,8	4,0	4,7	6,9	7,9	7,1
Corazón	3,2	6,5	23,1	47,5	34,0	16,0	1,3	2,9	8,1	20,0	38,8	74,5	0,8	1,1	2,3	5,3	6,7	5,8
Pulmón	0,9	1,3	1,5	1,3	1,2	0,6	0,7	1,1	2,3	4,3	12,3	29,8	0,7	1,0	1,6	3,4	4,5	3,7

114

225

Tabla 4 Parámetros cinéticos para la depuración de sangre de las tres formas del anticuerpo L19

	α		β	
	(%) ^{a)}	t _{1/2} (h)	(%) ^{a)}	t _{1/2} (h)
L19(scFv)	96,7	0,53	3,3	8,00
L19-SIP	83,7	1,06	16,3	10,66
L19-IgG1	76,9	1,48	23,1	106,7

^{a)} Magnitud relativa de los dos componentes de la vida media

~~147~~

Tabla 5 Experimentos de biodistribución de L19(scFv) y L19SIP marcados radioactivamente en ratones portadores del tumor F9

L99 (scFv)	3h	6h	24h	48h
TUMOR	10,43 ± 1,75	8,15 ± 2,63	3,18 ± 0,83	2,83 ± 0,71
Sangre	2,05 ± 0,38	1,88 ± 1,14	0,17 ± 0,01	0,06 ± 0,02
Hígado	1,62 ± 1,67	0,73 ± 0,51	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Bazo	1,53 ± 0,36	0,90 ± 0,54	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Riñón	12,70 ± 0,73	4,37 ± 0,98	0,24 ± 0,03	0,18 ± 0,08
Intestino	0,68 ± 0,15	0,95 ± 0,23	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,06
Corazón	1,35 ± 0,21	0,81 ± 0,38	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Pulmón	2,88 ± 0,29	2,06 ± 0,69	0,38 ± 0,69	0,33 ± 0,05
L19SIP	3h	6h	24h	48h
TUMOR	17,46 ± 1,93	16,65 ± 2,59	15,32 ± 2,17	12,00 ± 1,91
Sangre	13,51 ± 0,57	9,62 ± 1,18	1,73 ± 0,02	1,14 ± 0,20
Hígado	2,81 ± 0,37	2,39 ± 0,13	0,54 ± 0,14	0,32 ± 0,00
Bazo	3,42 ± 0,26	2,66 ± 0,27	0,61 ± 0,09	0,37 ± 0,01
Riñón	9,18 ± 0,76	5,85 ± 0,50	1,16 ± 0,05	0,76 ± 0,06
Intestino	0,95 ± 0,03	1,36 ± 0,21	0,83 ± 0,11	1,04 ± 0,14
Corazón	4,64 ± 0,24	3,67 ± 0,46	0,67 ± 0,06	0,46 ± 0,07
Pulmón	5,61 ± 0,01	5,93 ± 0,53	1,66 ± 0,19	0,91 ± 0,08

Los resultados se expresan como el porcentaje de dosis inyectada de anticuerpo por gramo de tejido (% ID/g)± DE

nd no determinado

105

227

	% de dosis / g de tejido		
	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
Bazo	5,0 ± 1,04	4,27 ± 0,27	4,86 ± 1,77
Hígado	10,80 ± 1,52	10,57 ± 1,44	10,68 ± 1,51
Riñón	14,30 ± 1,45	16,1 ± 2,42	22,48 ± 6,79
Pulmón	9,94 ± 1,72	6 15 ± 0,80	3,03 ± 0,95
Estómago sin contenido	1,10 ± 0,13	1,62 ± 0,19	1,66 ± 0,24
Intestino con contenido	1,67 ± 0,14	2,65 ± 0,30	2,64 ± 1,40
Tumor	12,93 ± 2,76	10,18 ± 2,28	12,96 ± 3,13
Sangre	17,10 ± 1,49	9,08 ± 0,96	1,98 ± 0,47

Tabla 6

	t de dosis / g de tejido		
	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
Bazo	6,92 ± 1,3	5,37 ± 0,23	2,06 ± 0,48
Hígado	14,65 ± 0,81	12,43 ± 0,37	4,62 ± 0,52
Riñón	22,07 ± 1,87	15,99 ± 1,10	5,92 ± 1,18
Pulmón	10,06 ± 1,67	5,33 ± 0,49	1,32 ± 0,25
Estómago sin contenido	2,18 ± 0,39	2,12 ± 0,09	1,15 ± 0,08
Intestino con contenido	3,03 ± 0,25	3,62 ± 0,58	1,20 ± 0,12
Tumor	17,20 ± 7,49	18,79 ± 5,35	9,42 ± 3,84
Sangre	16,53 ± 2,04	7,42 ± 0,21	0,73 ± 0,14

Tabla 7

	1h p.i.	3h p.i.	24h p.i.
Relación de tumor a sangre	1,01 ± 0,33	2,5 ± 0,74	2,81 ± 4,03

Tabla 8

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Philogen SRL
Schering AG
Borsi, Laura
Carnemolla, Barbara
Balza, Enrica
Castellani, Patrizia
Zardi, Luciano
Friebe, Matthias
Hilger, Christoph-Stephan
- <120> Reconocimiento dirigido selectivo de la vasculatura tumoral usando moléculas de anticuerpo marcadas radioactivamente
- <130> SMWFP6177075
- <140> EP 03255633.4
- <141> 2003-09-10
- <140> US 60/501.881
- <141> 2003-09-10
- <150>
- <151>
- <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- Ser Phe Ser Met Ser
 1 5
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<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

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

206
232

<400> 6

Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
1 5 10

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido ligador

<400> 7

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 8

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 8

gtgtgcacgc ggaggtgcag ctgttgagct ctggg

<210> 9

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 9

gcctccggat ttgatttoca ccttggtccc ttgggc

<210> 10

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 10
otogtgcact ogcaggtgca gotgcaggag tca

<210> 11
<211>30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 11
ctctcaggac cgtttgatot cgcgotttgt

<210> 12
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 12
tggtgtgcaac toggaaattg tgttgacgca gtc

<210> 13
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 13
ctctcgtaag tttgatttcc accttggtcc

REIVINDICACIONES:

1. Un elemento de unión específico que se une al ED-B humano, donde dicho elemento de unión específico está marcado con un isótopo seleccionado del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At y comprende un sitio de unión al antígeno que comprende un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL, donde dicho dominio de anticuerpo VH se selecciona del grupo formado por el dominio VH de L19 y un dominio VH que comprende una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, donde dicha VH CDR3 es la L19 VH CDR3 de la SEQ ID N°: 3, la VH CDR1 es opcionalmente la L19 VH CDR1 de la SEQ ID N°: 1 y la VH CDR2 es opcionalmente la L19 VH CDR2 de la SEQ ID N°: 2; y donde el dominio de anticuerpo VL se selecciona opcionalmente del grupo formado por el dominio VL de L19 y un dominio VL que comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3, donde la VL CDR3 es la L19 VL CDR3 de la SEQ ID N°: 6, la VH CDR1 es opcionalmente la L19 VL CDR1 de la SEQ ID N°: 4 y la VL CDR2 es opcionalmente la L19 VL CDR2 de la SEQ ID N°: 5; donde las secuencias del dominio VH de L19 y del dominio VL de L19 se describen en Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776; donde el elemento de unión específico comprende una mini-inmunoglobulina que comprende dicho dominio de anticuerpo VH y el dominio de anticuerpo VL fusionados a $\epsilon\text{S}_2\text{-CH}_4$ y dimerizados o bien, comprende una molécula completa del anticuerpo IgG1.

2. El elemento de unión específico acorde con la reivindicación 1 que comprende un dominio de anticuerpo VH que comprende las CDR de VH con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3, donde dicho elemento de unión específico compite por la unión a ED-B con un dominio de unión a ED-B de un anticuerpo que comprende el dominio VH de L19 y el dominio VL de L19.
3. El elemento de unión específico acorde con la reivindicación 1 o con la reivindicación 2 que comprende el dominio VH de L19.
4. El elemento de unión específico acorde con la reivindicación 3 que comprende el dominio VL de L19.
5. El elemento de unión específico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es una mini-inmunoglobulina que comprende ϵ_{s2} -CH4.
6. El elemento de unión específico acorde con la reivindicación 5 donde el dominio de anticuerpo VH y el dominio de anticuerpo VL se encuentran dentro de una molécula de anticuerpo scFv fusionado a ϵ_{s2} -CH4.
7. El elemento de unión específico acorde con la reivindicación 6 donde la molécula de anticuerpo scFv está fusionado a ϵ_{s2} -CH4 a través de un péptido ligador.
8. El elemento de unión específico acorde con la reivindicación 7 donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido ligador es GGSG (SEQ ID N°: 7).

9. El elemento de unión específico de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 1 a 4 que comprende una molécula completa del anticuerpo IgG1.

10. El elemento de unión específico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el isótopo es ^{131}I .

11. Un método para producir un elemento de unión específico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho método comprende marcar un elemento de unión específico con un isótopo seleccionado del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At .

12. El método acorde con la reivindicación 11, donde dicha marcación comprende oxidar un halogenuro seleccionado del grupo formado por $^{76}\text{Br}^-$, $^{77}\text{Br}^-$, $^{123}\text{I}^-$, $^{124}\text{I}^-$, $^{131}\text{I}^-$ y $^{211}\text{At}^-$ en presencia del elemento de unión específico.

13. El método acorde con la reivindicación 11, donde dicha marcación comprende conjugar un vehículo de halógeno bifuncional activado, que contiene un radioisótopo seleccionado del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At , con un residuo lisina o cisteína o con el extremo N terminal del elemento de unión específico.

14. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde dicho método comprende expresar el ácido nucleico que codifica el elemento de unión específico antes de la marcación.

15. El método acorde con la reivindicación 14, que comprende cultivar células huésped bajo condiciones que permitan producir el elemento de unión específico.
16. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que además comprende aislar y/o purificar el elemento de unión específico.
17. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, que además comprende formular el elemento de unión específico en una composición que incluya al menos un componente adicional.
18. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, que además comprende unir el elemento de unión específico a ED-B o a un fragmento de ED-B.
19. Un método que comprende unir el elemento de unión específico que se une ED-B acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 a ED-B o a un fragmento de ED-B.
20. El método acorde con la reivindicación 18 o con la reivindicación 19, donde dicha unión tiene lugar *in vitro*.
21. El método acorde con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que comprende determinar la cantidad de unión del elemento de unión específico a ED-B o a un fragmento de ED-B.
22. Una composición que comprende un elemento de unión específico acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo

humano o de un animal mediante una terapia.

23. La composición acorde con la reivindicación 22, para su uso en un método de tratamiento de una lesión de angiogénesis patológica.

24. La composición acorde con la reivindicación 22, para su uso en un método de tratamiento de un tumor.

25. La composición acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en un método de diagnóstico.

26. El uso de un elemento de unión específico acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la elaboración de un medicamento para tratar una lesión de angiogénesis patológica.

27. El uso de un elemento de unión específico acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la elaboración de un medicamento para tratar un tumor.

28. El uso de un elemento de unión específico acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la elaboración de un reactivo de diagnóstico.

Figura 1A

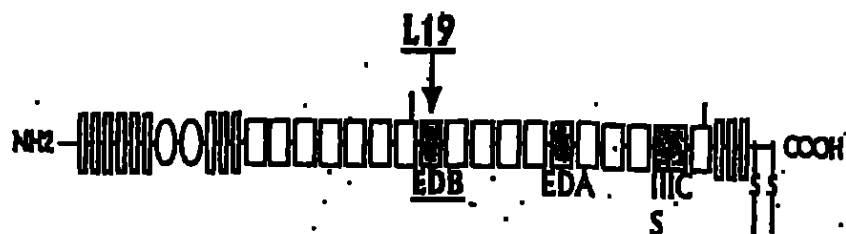


Figura 1B

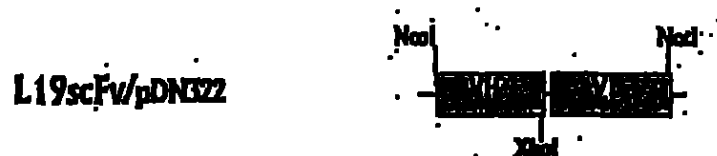


Figura 1C

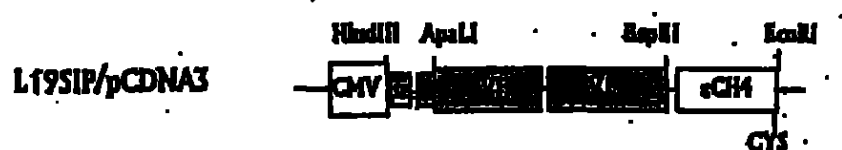


Figura 1D

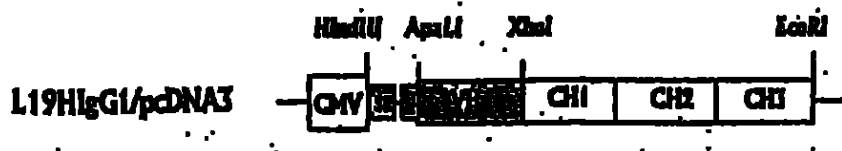
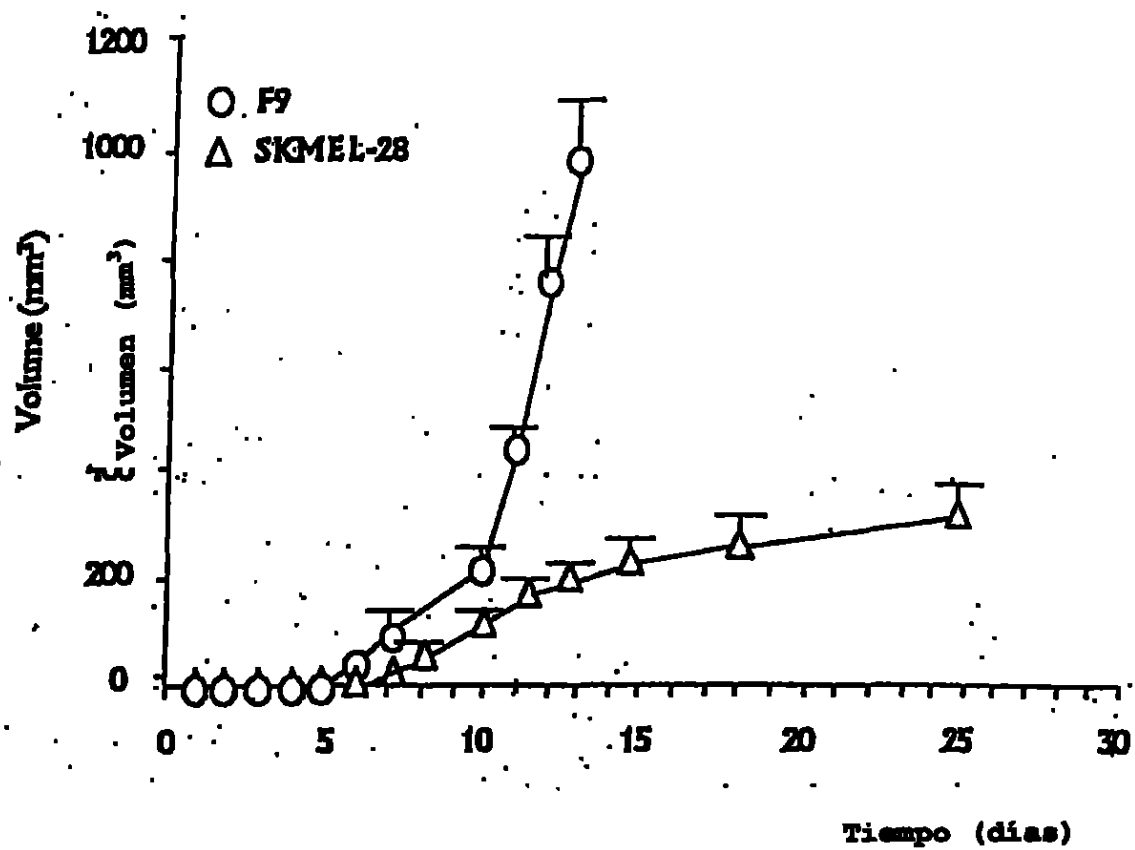
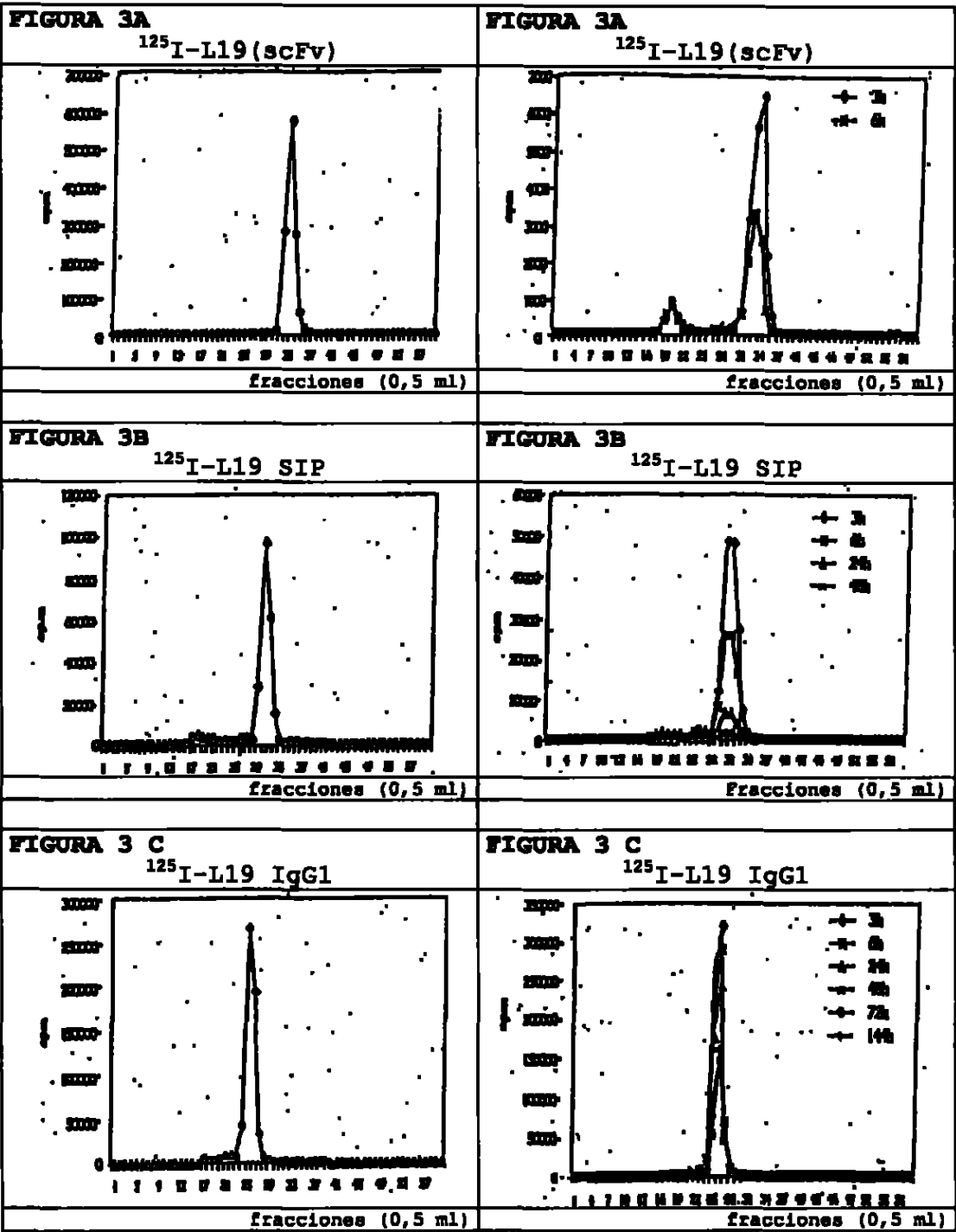


Figura 2





109 274
242

FIGURA 4A

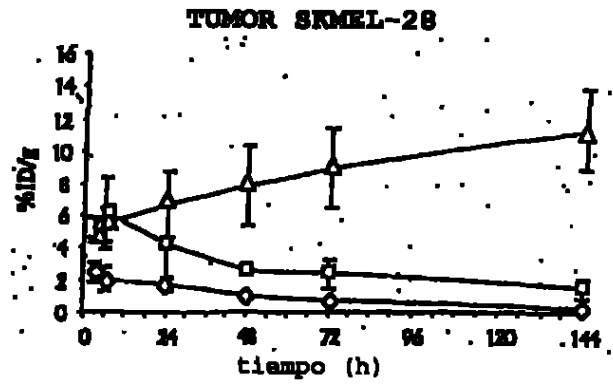


FIGURA 4B

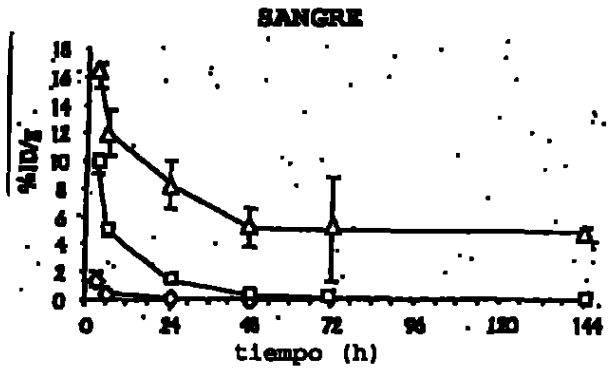
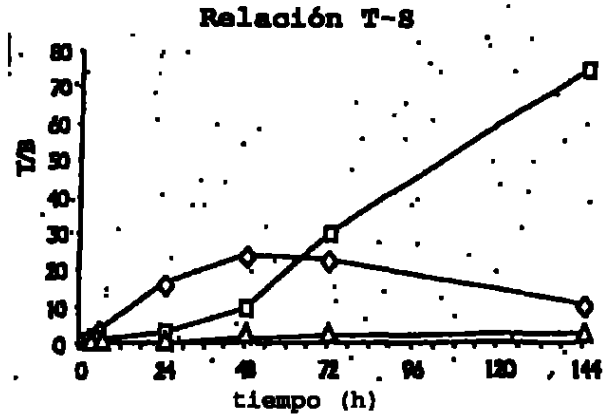


FIGURA 4C.



110 275
243

Figura 5A

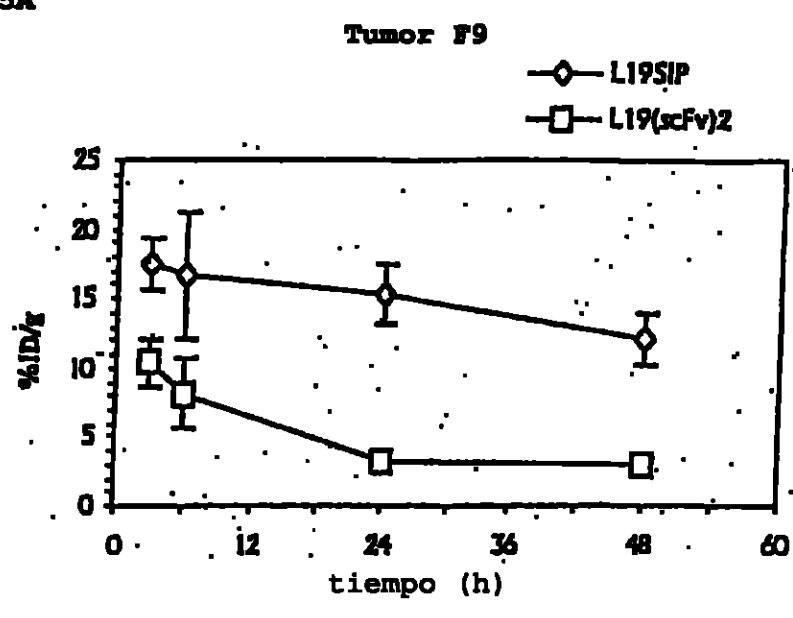


Figura 5B

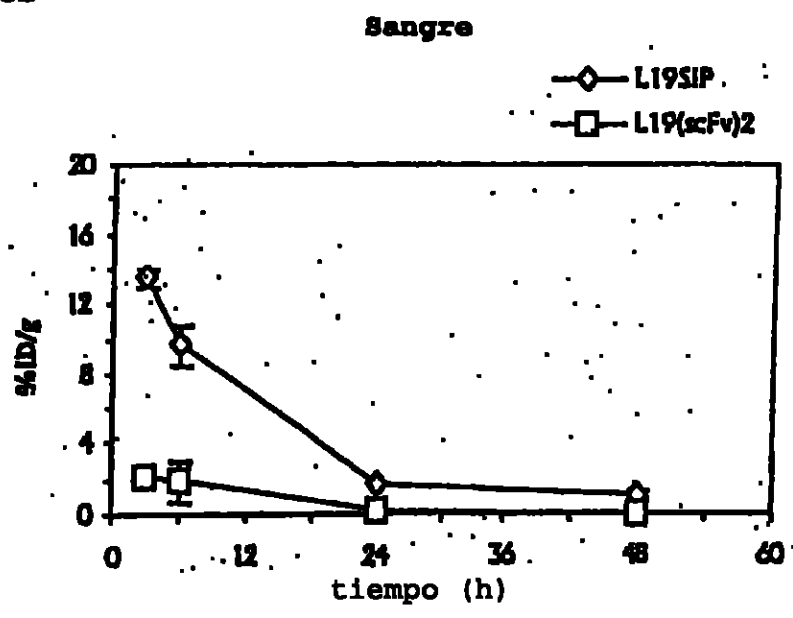
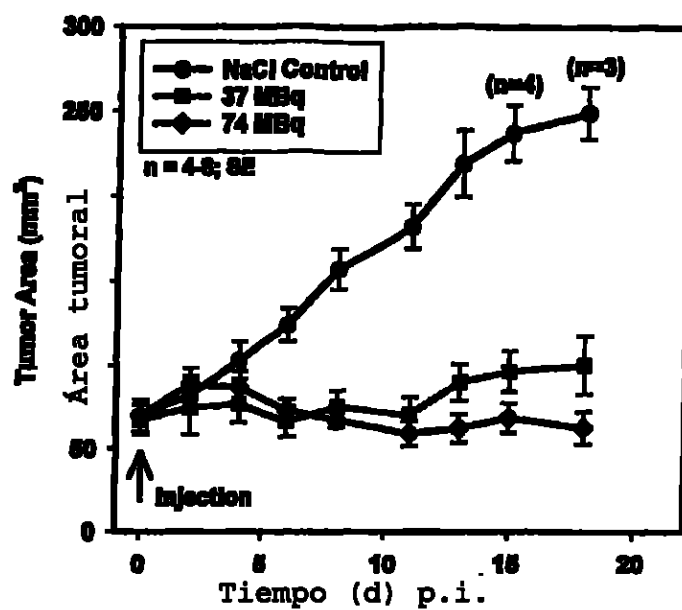


FIGURA 6



TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

217
245

Remitente: EL ORGANISMO DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL

A

WALTON, Sean
Mawburn Ellis LLP
York house
23 kingsway
London greater London WC2B 8HP
GRAN BRETAÑA

PCT

NOTIFICACIÓN DE ENVÍO DEL INFORME DEL
EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(regla PCT Nº 71.1)

Fecha de envío (día/mes/año)	04.08.2004
---------------------------------	------------

Referencia del Solicitante o Agente SMWFP6235147	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE	
Referencia Internacional PCT/EP 2004/008733	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 01.09.2004	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 10.09.2003
Solicitante PHILOGEN S.P.A.		

- Se notifica al solicitante que el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional envía mediante la presente el Informe de Examen Preliminar Internacional elaborado para esta Solicitud Internacional, en casos dados, con los anexos correspondientes.
- Una copia del Informe – en casos dados, con los anexos correspondientes – es enviada a la Oficina Internacional para su derivación a todos los organismos seleccionados.
- A petición de un organismo seleccionado, la Oficina Internacional traducirá el Informe (pero no sus anexos) al inglés y lo enviará a tal organismo.
- RECORDATORIO**

Para el ingreso en la fase nacional, el solicitante debe proceder, dentro de los 30 meses de la fecha de prioridad (o más tarde en otros organismos), a llevar a cabo ciertos trámites (presentación de traducciones y pago de tasas nacionales) (artículo 39 (1)) (ver también la Información brindada por la Oficina Internacional por medio del formulario PCT/IB/301).

Cuando se debe enviar a un organismo seleccionado una traducción de la solicitud Internacional, esta traducción debe contener también las traducciones de todos los anexos del Informe del Examen Preliminar Internacional. Es responsabilidad del solicitante elaborar tales traducciones y enviarlas directamente al organismo correspondiente seleccionado.

Otros detalles de los plazos y requisitos normativos de los organismos seleccionados se pueden tomar del Manual PCT para solicitantes.

El solicitante es advertido acerca del artículo 33 (5) en el cual se aclara que los criterios de novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial descriptos en el artículo 33 (2) a (4) solo tiene significado para el Examen Preliminar Internacional, y que "cada estado adherido (...) puede disponer atributos adicionales o modificatorios en tal estado para la determinación de la patentabilidad de la invención reivindicada " (ver también artículo 27 (5)). Tales atributos adicionales se pueden referir, por ejemplo, a excepciones de patentabilidad, a requisitos para la revelación de la invención, así como a claridad y apoyo de las reivindicaciones.

Nombre y Dirección Postal del Organismo encargado del Examen Preliminar Internacional Oficina de Patentes Europea – P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk – Países Bajos Tel. ++31 70 340 – 2040; Tx: 31 851 epo nl Fax: +31 70 340 – 3018	Funcionario Apoderado Cherqui, E Tel: +31 70 340-2843
---	---

Formulario PCT/IPEA/416 (enero 2004)

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes)

Referencia del Solicitante o Agente SAM/FP0235147	PROCEDER Ver formulario PCT/IPEA/416)	
Referencia Internacional PCT/EP 2004/009937	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 01.09.2004	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 10.09.2003
Clasificación Internacional de Patente (CIP) o Clasificación Nacional y CIP A61K51/10		
Solicitante PHILOGEN S.P.A.		

1.	Este informe se trata del Examen Preliminar Internacional, confeccionado por el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional según el artículo 35 y enviado al solicitante según el artículo 36.
2.	Este INFORME comprende, en total, 11 hojas, incluida esta carátula.
3.	Además, este informe posee ANEXOS; los mismos comprenden: a. ☐ (remitidos al solicitante y a la Oficina Internacional) en total hojas; aquí se trata de: ☐ hojas con las descripciones, reivindicaciones, y/o ilustraciones que fueron modificadas y en las cuales se basó este informe y/u hojas con correcciones que aprobó el organismo (ver regla 70.16 y sector 607 de los reglamentos administrativos de PCT). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores pero que, según opinión del organismo, contienen una modificación por los motivos indicados en el campo N° 1, punto 4, superando el contenido revelado en la Solicitud Internacional en la versión presentada originalmente. b. ☐ (remitidos solo a la Oficina Internacional) > en total (rogamos indicar tipo y cantidad del (los) soporte(s) electrónico(s) que contiene(n), solo en forma legible por computadora, el (los) protocolo de secuencias y/o las tablas correspondientes tal como está indicado en el campo suplementario referido al protocolo de secuencias (ver sector 602 de las normas administrativas

Fecha de presentación de la solicitud 02.08.2005	Fecha de confección de este informe 19.09.2005
Nombre y Dirección Postal del organismo encargado del Examen Internacional Oficina de Patentes Europea – P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk – Países Bajos Tel. ++31 70 340 – 2040; Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 – 3016	Funcionario Apoderado Gonzalez Ramon, N Tel: +31 70 340-3486

Formulario PCT/IPEA/409 (carátula)(enero 2004)

Campo N° I	Fundamento del Informe
------------	------------------------

1. Con respecto al idioma, el informe está basado sobre la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada, en tanto en este punto no se indique otra cosa.
 - ☐ El informe está basado sobre una traducción del idioma original al siguiente idioma, el que se trata del idioma de la traducción suministrada a los siguientes efectos:
 - ☐ búsqueda internacional (según reglas 12.3 y 23.1 b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según regla 55.2 y 55.3)
 2. Con respecto a los elementos* de la Solicitud Internacional, el informe se basa en (las hojas de reemplazo que fueron presentadas al organismo como requisito según el artículo 14 son válidas como "presentadas originalmente" en el marco de este informe y no se adjuntan):

Descripción, páginas

1 – 78 en la versión presentada originalmente.

Reivindicaciones, N°

1 – 28 en la versión presentada originalmente.

Ilustraciones, hojas

1/8 – 6/8 en la versión presentada originalmente.

☒ un listado de secuencias y/o algunas tablas que correspondan – con respecto al protocolo de secuencias, ver campo adicional.
 3. ☐ Como consecuencia de las modificaciones caducaron los siguientes documentos:
 - ☐ Descripción: páginas
 - ☐ Reivindicaciones N°:
 - ☐ Ilustraciones: hoja/figura
 - ☐ Listado de secuencias (especificar):
 - ☐ Eventuale(s) tabla(s) perteneciente(s) al listado de secuencias (especificar):
 4. ☐ Este informe fue elaborado sin tomar en consideración (algunas de) las modificaciones, dado que las mismas, según opinión del organismo y por los motivos expresados, exceden el contenido revelado en el texto presentado originalmente (regla 70.2(c)), tal como se indica en el campo suplementario..
 - ☐ Descripción: páginas
 - ☐ Reivindicaciones N°:
 - ☐ Ilustraciones: hoja/figura
 - ☐ Listado de secuencias (especificar):
 - ☐ Eventuale(s) tabla(s) perteneciente(s) al listado de secuencias (especificar):
- * Cuando corresponde el punto 4, algunas o todas estas hojas pueden estar provistas de la observación "reemplazada".

**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

Referencia Internacional
PCT/EP 2004/007933

220
248

Campo Nº III **No realización de ningún dictamen sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial**

Las siguientes partes de la solicitud no fueron examinadas acerca de si la invención reivindicada es considerada como novedosa, descansa en actividad inventiva (no obvio) o es aplicable industrialmente.

- ☐ La solicitud internacional completa
- ☒ Reivindicaciones 1 – 26 (en parte)

Porque:

- ☐ toda la solicitud internacional o las reivindicaciones Nº – mencionadas anteriormente se refieren al objeto siguiente, para el cual no es necesario efectuar un Examen preliminar internacional (especificar):
- ☐ la descripción, las reivindicaciones o las ilustraciones (se ruega especificar detalladamente) o las reivindicaciones Nº mencionadas anteriormente son tan poco claras que no se pudo realizar ningún peritaje coherente (especificar):
- ☐ las reivindicaciones o las reivindicaciones Nº mencionadas anteriormente están tan poco apoyadas por la descripción que no se pudo realizar ningún peritaje coherente (especificar):
- ☒ no se realizó ningún Informe de Búsqueda Internacional para las reivindicaciones indicadas anteriormente.
- ☐ el protocolo de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos no se corresponde en el anexo C con el standard prescrito en las normas administrativas, porque
- la forma escrita ☐ no fue presentada
- ☐ no se corresponde con el standard
- la forma legible por computadora ☐ no fue presentada
- ☐ no se corresponde con el standard
- ☐ Las tablas del protocolo de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, en tanto existen solo en forma legible por computadora, no se corresponden en el anexo C-bis con los requisitos técnicos prescritos en las normas administrativas
- ☐ Para otras indicaciones, ver hoja adjunta

22/
249

Campo Nº V Resolución fundada según el artículo 35(2) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinadas a apoyar esta resolución

1. Resolución

Novedad (N)	SI	Reivindicaciones:	10 – 21
	No	Reivindicaciones:	1 – 9, 1 – 20, 22 – 28
Actividad Inventiva (IS)	SI	Reivindicaciones:	
	No	Reivindicaciones:	1 – 28
Aplicabilidad industrial (IA)	SI	Reivindicaciones:	1 – 28
	No	Reivindicaciones:	

2. Documentos y aclaraciones (regla 70.7):

ver hoja adjunta

Campo Nº VI Documentos definidos mencionados

1. Documentos definidos publicados (regla 70.10)

y/o

2. Revelaciones no escritas (regla 70.9)

ver hoja adjunta

Campo Suplementario referente al listado de secuencias

Continuación del campo I, ítem 2:

1. Con respecto a toda secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, este informe ha sido confeccionado en base a:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencias
 - ☐ una tabla relacionada con el listado de secuencias
 - b. formato del material
 - ☒ en forma escrita
 - ☒ en forma legible por computadora
 - c. momento de presentación/suministro
 - ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
 - ☐ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computadora
 - ☒ suministrada posteriormente a este organismo a los propósitos de una búsqueda o examen
 - ☒ recibida por este organismo como una enmienda el
2. Adicionalmente, en el caso de que haya sido presentada o suministrada más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tablas relacionadas con el mismo, se debe acompañar la declaración requerida de que la información obrante en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal como fue presentada o no supera el ámbito de la solicitud tal como fue presentada, como corresponda.
3. Observaciones adicionales, si son necesarias

Con respecto al ítem III

No confección de Informe con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial

En la presente solicitud el Organismo de Búsqueda Internacional restringió la búsqueda, según los artículos PCT 5 y 6, por las siguientes objeciones:

Las realizaciones de la invención descritas desde la página 46, renglón 5 a la página 56 y en las tablas 6 – 8 de la descripción, en tanto se refieren a los rotulados miembros humanos de enlace ED-B Tc 99m, Re 188, In 111, Y88, Lu 177, no caen en el ámbito de las reivindicaciones. Esta inconsistencia entre las reivindicaciones y la descripción resultan en dudas con respecto al objeto para el cual se pretende la protección, haciendo entonces poco claras las reivindicaciones (artículo PCT 6).

La presente reivindicación 1 no es clara con respecto a su referencia en "secuencias de dominio dadas a conocer en Pini et al. /1998) J. Biol. Chem. 273: 21769 – 21776". Una reivindicación debe ser clara sin hacer referencia a la descripción.(artículo PCT 6).

Las presentes reivindicaciones 1 – 4, 9 – 28 no están apoyadas por la descripción.

Ninguna parte de la presente solicitud revela o ejemplifica el miembro de enlace específico reivindicado que enlaza ED-B humano, en tanto el miembro de enlace es rotulado como un isótopo seleccionado entre 76Br, 77Br, 123I, 124I, 131I y 211 At y comprende una molécula de anticuerpo IgG1 completa.

La revelación y los ejemplos de la presente solicitud se refieren a los isótopos reivindicados que comprenden únicamente una mini-inmunoglobulina, denominada SIP (páginas 27 – 38), en tanto que para la molécula completa rotulada IgG1 tabulada a modo de ejemplo, el único isótopo revelado es 125I (páginas 39 – 46), cayendo, en consecuencia, fuera del ámbito de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 9 – 28.

En consecuencia, la presente solicitud carece de una revelación efectiva para un miembro de enlace específico que comprende simultáneamente ambos aspectos técnicos: isótopos seleccionados entre 76Br, 77Br, 123I, 124I, 131I y 211 At y un anticuerpo IgG1 completo, tal como está reivindicado en las presentes reivindicaciones 1– 28.

En consecuencia, la presente solicitud carece de revelación (artículo PCT 5).

Además, la reivindicación 7 abarca un género de compuestos definido solo por su función "péptido de enlace", en la que la relación entre los aspectos estructurales de los miembros del género y tal función no está definida.

En ausencia de tal relación revelada en la solicitud tal como fue presentada o que fue reconocida en base a información ya disponible para una persona experimentada en la materia, el artesano experimentado puede no saber como preparar y usar compuestos que carecen de definición estructural.

El hecho de que se puede haber ensayado un compuesto de interés utilizando los ensayos descriptos no evita este defecto desde que no se tiene conocimiento anterior de cuando o no algún compuesto dado (distinto al que puede ser particularmente revelado en una solicitud) puede caer dentro del ámbito de lo que es reivindicado.

Esto puede requerir una debida experimentación (es una carga excesiva) para rastrear al azar compuestos indefinidos para la actividad reivindicada.

No se confecciona ningún informe con respecto a un objeto que no está cubierto por el informe de búsqueda (regla PCT 66.1(e)).

Con respecto al ítem V

Resolución fundada con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial, menciones y declaraciones que apoyan dicha resolución

Se hace notar al solicitante el hecho de que lo que el presente informe expresa como novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial se refiere solo al objeto para el cual se realizó una búsqueda internacional.

No se confecciona ningún informe acerca del objeto que no está cubierto por el informe de búsqueda (regla PCT 66.1(e)).

1. Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: BORSIL ET AL.: INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEM YORK, NY, US VOL. 102, nº 1, 1 de noviembre de 2002, páginas 75 – 85
- D2: DEMARTIS S. ET AL.: EUR. J. NUCL. MED., vol. 28 Nº 4, abril 2001, páginas 534 – 539
- D3: SANTIMARIA ET AL.: CLIN. CANCER RES., vol. 9 febrero 2003, páginas 571 – 579
- D4: WO 03/055917 A (BERNDORFF DIETMAR) 10 de julio de 2003
- D5: WO 01/62800 A (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE), 30 de agosto de 2001
- D6: WO 01/68599 A (PHILOGEN S.P.A: (IT)), 20 de diciembre de 2001
- D7: LI ERQIU ET AL.: PROTEIN ENGINEERING, vol 10, Nº 8, 1997, páginas 731 – 738

Novedad (artículo PCT 33(2))

La presente solicitud no cumple con los criterios del artículo PCT 33(2), porque el objeto de las reivindicaciones 1 – 9, 11 – 20, 22 – 28 no es nuevo en el sentido del artículo PCT 33(2).

Contrariamente a las declaraciones del solicitante, se hace notar que el contenido de la presente solicitud abarca efectivamente compuestos rotulados con 125I entre sus realizaciones, como está ejemplificado en el ejemplo de la página 39, así como compuestos rotulados con scFv, como está indicado en la descripción, páginas 39 y 41, figuras 1B, 3A, 3D, 5ª y 5B.

Además, el texto de la reivindicación 1, en el cual el miembro de enlace específico comprende una mini-inmunoglobulina o comprende una molécula completa de anticuerpo Ig1, no se interpreta como un aspecto restrictivo.

En consecuencia, los documentos del estado de la técnica que dan a conocer los compuestos mencionados arriba (compuestos rotulados con 125I, así como con scFv) son documentos que lesionan la novedad para el objeto de la presente solicitud.

D1 da a conocer diferentes formatos (scFv, mini-inmuglobulina e IgG1) del anticuerpo L19 del dominio ED-B de fibronectina (ver figura 1). Se describe un método para la producción de una estructura de mini-inmuglobulina (rotulada SIP) que utiliza *primer* BC-618 y BC-619 (idénticos para el ejemplo de la página 35 de la presente solicitud, secuencia ID 8 y secuencia ID 9) con un ligante GGSG y un método para la producción el IgG1 completo utilizando *primer* BC-666 y BC-667 (idénticos para el ejemplo de la página 35 de la presente solicitud, secuencia ID 12 y secuencia ID 13), así como su radioiodación con 125I (idénticos para el ejemplo de la página 39 de la presente solicitud) (ver página 76; página 77, columna 2).

Se discuten el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral con los anticuerpos radiorotulados y usos diagnósticos (ver página 84). También se revela la aplicación particular de isótopos de vida media corta (abarcando isótopos como los reclamados en la reivindicación 1) en inmunoscintilografía para diagnóstico *in vivo* (ver página 83, columna 2, párrafo 1).

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 – 9, 11 – 19, 22 – 28 no es novedoso con respecto a D1.

D2, documento mencionado por el solicitante, da a conocer (ver discusión) el bombardeo selectivo de vasculatura tumoral por un fragmento de anticuerpo humano radiohalogenado scFv específico para el dominio ED-B de fibronectina. También se describen métodos para la producción de anticuerpos en bacterias, purificación y radiohalogenación con ²¹¹At vía oxidación de un radiohalogenuro y conjugación del vehículo halogenado bifuncional (ver página 535, figura 1).

Dado que scFv está abarcado entre los miembros de enlace específico de la presente solicitud (como en la descripción, páginas 33, 4; figuras 1B, 3A, 3D, 5A, 5B), en consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 11 – 17, 22 – 24, 26, 27 no es novedoso desde el punto de vista de D2.

D3 da a conocer la detección inmunoscintigráfica del dominio ED—B de la fibronectina, un marcador de angiogénesis, en pacientes con cáncer con ¹²³I L19 (scFv)2.

Se describen métodos para la producción de anticuerpos en bacterias, purificación y radiohalogenación con ¹²³I vía cloramina Ty conjugación del vehículo halogenado bifuncional (ver página 572). Se discuten aplicaciones diagnósticas y terapéuticas basadas sobre el uso de L19(scFv)2 radiorotulados (ver discusión).

Vemos que scFv está abarcado entre los miembros de enlace específico de la presente solicitud, como se aprecia en la descripción, figura 1B, en consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 11 – 19, 22 – 28 no es novedoso con respecto a D3.

D5 revela el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral con anticuerpos scFv radiorotulados (L19) en el dominio ED-B de la fibronectina con secuencias VH y VI como las reclamadas en la presente reivindicación 1 (ver secuencia ID 19, secuencia ID 21). Se revelan variantes funcionalmente equivalentes radioiodadas y radiorotuladas ²¹¹At L 19 (ver reivindicaciones 11 – 13, 25 – 27, ejemplos 7, figura 16). Se dan a conocer métodos de tratamiento de patologías relacionadas con angiogénesis, tales como tumores (ver reivindicaciones 32, 33; ejemplo 3, figura 15).

En consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 11 – 17, 22 – 24, 26, 27 no es novedoso con respecto a D5.

D6 da a conocer la detección *in vitro* de fibronectina B en tejidos tumorales con el anticuerpo L 19 radiorotulado contra la ED-B de la fibronectina (ver ejemplo 4; reivindicación (8). En consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 18 – 20 no es novedoso con respecto a D6.

Actividad Inventiva (artículo PCT 33(3))

La presente solicitud no cumple los criterios del artículo PCT 33(1), porque el objeto de las reivindicaciones 1 – 28 no involucra una actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33(3).

El problema a resolver por la presente solicitud es la estabilidad, eliminación y actuación *in vivo* con anticuerpos en bombardeos tumorales selectivos (ver página 4, renglones 14 – 16).

La solución propuesta es la utilización de formatos de anticuerpos radiorotulados (L 19): scFv, minianticuerpos e IgG1 contra el dominio ED-B de la fibronectina en el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral en usos diagnósticos y terapéuticos, así como el método de producción de los mismos.

El documento D2 del estado de la técnica indica el bombardeo de vasculatura tumoral con la utilización del scFv del anticuerpo L 19 en el dominio ED-B de la fibronectina (ver discusión). Se describe también la radiohalogenación con ²¹¹At vía oxidación de un radiohalogenuro y la conjugación del vehículo halogenado bifuncional (ver página 535, fig. 1).

227
254

La diferencia entre D2 y el objeto de la presente solicitud es el hecho de que los otros formatos de anticuerpos L 19 mencionados en las reivindicaciones 5 – 9, así como los usos *in vitro* de los miembros de enlace específicos tales como los reclamados en las presentes reivindicaciones 20, 21, no están citados específicamente en tal documento.

El especialista ha intentado con expectativas de éxito la utilización de un minianticuerpo estructurado como está descrito en D7 (ver Introducción, figura 1) como un formato efectivo de anticuerpo contra el dominio ED-B de la fibronectina para el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral en usos terapéuticos y diagnósticos. Se ha visto reforzado en esta opción por la enseñanza de este documento, que establece que "los genes de anticuerpos pueden ser manipulados para construir una variedad de nuevas moléculas" y "se prefiere el fragmento de anticuerpo (SIP) en lugar de anticuerpos intactos en el tratamiento de tumores sólidos, por su mejor penetración en los tejidos. También la rápida eliminación *in vivo* es ideal para el diagnóstico por imagen. También su rápida remoción *in vivo* es ideal para una imagen de diagnóstico" (ver página 731, columna 1).

Se toma además en consideración que las secuencias del miembro de enlace específico contra el dominio ED-B de la fibronectina son bien conocidas en el estado de la técnica, es decir, en los documentos D1, D2 y D5 previamente discutidos (en la tabla 1 de D4 están representadas las identidades secuenciales HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de los anticuerpos en lugar de las presentes secuencias ID 1-3 y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en lugar de las secuencias ID 4-6 respectivamente).

En consecuencia, no se puede reconocer una actividad inventiva para el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 28.

Con respecto al ítem VI
Documentos definidos mencionados

Documentos definidos publicados

Solicitud Nº Patente Nº	Fecha de publicación (día/mes/año)	Fecha de presentación (día/mes/año)	Fecha de prioridad (reivindicación citada) (día/mes/año)
WO 03/076469	18/09/2003	11/03/2003	11/03/2003

La solicitud PCT WO 03/076469 muestra: bombardeo selectivo de vasculaturas tumorales con diferentes formatos radiorotulados (se prefieren los isótopos Tc, Re, In, Y, Lu) de anticuerpos (L 19) del dominio ED-B de la fibronectina, incluyendo mini-inmunoglobulina e IgG1 completo, que comprende secuencias tales como las reclamadas por la presente reivindicación 1 (ver reivindicaciones 1 – 9) y sus conjugados radiorotulados (ver reivindicación 10), ejemplificadas particularmente con la preparación de derivados radiolodados (ver página 29, renglón 30 - . página 30, renglón 28).

Por ello, puede lesionar la novedad del objeto de las reivindicaciones 1 – 9, 19, 20, 22 – 28 de la presente solicitud.

PATENT COOPERATION TREATY

228
255

From
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

WALTON, Seán
Mewburn Ellis LLP
York House
23 Kingsway
London Greater London WC2B 6HP
GRANDE BRETAGNE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

RECEIVED

19 SEP 2005

Date of mailing
(day/month/year)

19.09.2005

Applicant's or agent's file reference
SMWEP8235147

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2004/009733

International filing date (day/month/year)
01.09.2004

Priority date (day/month/year)
10.09.2003

Applicant
PHILOGEN S.P.A

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the International application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the International
preliminary examining authority:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 851 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

Cherqui, E

Tel. +31 70 340-2843



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference SMWFP6235147		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEAM16
International application No. PCT/EP2004/009733		International filing date (day/month/year) 01.09.2004		Priority date (day/month/year) 10.09.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K51/10				
Applicant PHILOGEN S.P.A				
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 11 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).				
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☒ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand 02.06.2005		Date of completion of this report 19.09.2005		
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3018		Authorized Officer Gonzalez Ramon, N Telephone No. +31 70 340-3488 		

230
257

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/009733

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-78 as originally filed

Claims, Numbers

1-28 as originally filed

Drawings, Sheets

1/5-6/6 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/009733

231
258

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:
- ☐ the entire international application,
 - ☒ claims Nos. 1-28 in part
because:
 - ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
 - ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
 - ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 1-28 in part
 - ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
 - ☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/009733

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	10,21
	No: Claims	1-9,11-20,22-28
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-28
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-28
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/009733

233
260

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the International application as filed
 - ☐ filed together with the International application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☒ received by this Authority as an amendment on
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional observations, if necessary:

234
261

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/009733

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

In the present application, the International Searching Authority has restricted the search under the following objections under Articles 5 and 6 PCT.

The embodiments of the invention described on page 46 line 5 to page 56 and on tables 6-8 of the description, as they refer to **Tc 99m, Re 188, In 111, Y 88, Lu 177** labelled human ED-B binding member, do not fall within the scope of the claims.

This inconsistency between the claims and the description leads to doubt concerning the matter for which protection is sought, thereby rendering the claims unclear (Article 6 PCT).

Present claim 1 as far as in its reference to "domain sequences being disclosed in Pini et al (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776" is unclear. A claim should be clear without a reference to the description (Art. 6 PCT).

Present claims 1-28 are not supported by the description:

No part of the present application discloses or exemplifies the claimed specific binding member that binds human ED-B wherein the binding member is labelled with an **isotope selected from 76Br, 77 Br, 123I, 124I, 131I and 211At AND comprises a whole IgG1 antibody molecule.**

The disclosure and examples of the present application related to binding members labelled with the claimed isotopes refer uniquely to a mini-immunoglobulin, namely SIP (description pages 27-38); whereas for a labelled IgG1 molecule, the solely isotope disclosed is 125I (description pages 39-46) falling out of the scope of isotopes listed on present claims 1-28.

Consequently the present application fails to effectively disclose a specific binding member comprising both technical features simultaneously: **isotope selected from 76Br, 77 Br, 123I, 124I, 131I or 211At AND a whole IgG1 antibody** as claimed by present claims 1-28.

Therefore the present application lacks disclosure (Art 5 PCT).

Moreover claim 7 encompass a genus of compounds defined only by their function "linker peptide" wherein the relationship between the structural features of the members of the genus and said function have not been defined.

In the absence of such a relationship either disclosed in the as-filed application or which

235
262

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/009733

would have been recognized based upon information readily available to one skilled in the art, the skilled artisan would not know how to make and use compounds that lack structural definition.

The fact that one could have assayed a compound of interest using the described assays does not overcome this defect since one would have no knowledge beforehand as to whether or not any given compound (other than those that might be particularly disclosed in an application) would fall within the scope of what is claimed.

It would require undue experimentation (be an undue burden) to randomly screen undefined compounds for the claimed activity. Therefore, claim 7 does not fulfil the requirements of Art. 5 and Art 6 PCT.

No International preliminary examination will be carried out in respect of subject-matter which is not covered by the search report (Rule 66.1(e) PCT)

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The applicant's attention is drawn to the fact that the present opinion expressed as to novelty, inventive step and industrial applicability refers only to matter for which an international search report has been drawn up.

No opinion will be carried out in respect of subject-matter which is not covered by the search report (Rule 66.1(e) PCT)

Reference is made to the following documents:

- D1: BORSI L ET AL: INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 102, no. 1, 1 November 2002, pages 75-85.
- D2: DEMARTIS S. ET AL: EUR. J. NUCL. MED., vol. 28, no. 4, April 2001, pages 534-539
- D3: SANTIMARIA M. ET AL: CLIN. CANCER RES., vol. 9, February 2003, pages 571-579.
- D4: WO 03 055917 A (BERNDORFF DIETMAR) 10 July 2003
- D5: WO 01 62800 A (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE) 30 August 2001.
- D6: WO 01 98599 A (PHILOGEN S R L (IT)) 20 December 2001.
- D7: LI ERQIU ET AL: PROTEIN ENGINEERING, vol. 10, no. 8, 1997, pages 731-736.

Novelty Article 33(2) PCT

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-9, 11-20, 22-28 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

Contrary to the applicant statements, it is pointed out that the content of the present application effectively embraces compounds labelled with 125I among its embodiments as exemplified in example of page 39 as well as scFv labelled compounds as described on description pages 33 and 41; figures 1B, 3A, 3D, 5A and 5B.

Moreover the wording of claim 1 wherein the specific binding member **comprises** a mini-immunoglobulin or **comprises** a whole Ig1 antibody molecule is to be interpreted not as a restricting feature.

Consequently prior art documents disclosing the compounds mentioned above (compounds labelled with 125I as well as scFv labelled compounds) are novelty destroying documents for the subject matter of present application.

D1 discloses different formats (scFv, mini-immunoglobulin and IgG1) of antibody L19 to the ED-B domain of fibronectin (see figure 1). A method for production of mini-immunoglobulin construct (namely SIP) using primers BC-618 and BC-619 (identical to present application example on page 34, seq. ID 8 and seq ID 9) with a GGSG linker and a method for producing the complete IgG1 using primers BC-696 and BC-697 (identical to present application example page 35, seq. ID 12 and seq ID 13) are described. As well as their radioiodination with 125I via identical method disclosed on page 39 of the present application (see page 76; page 77 col 2).

Selective targeting of tumoral vasculature with the radiolabelled antibodies and diagnostic uses are discussed (see page 84). The particular application of short half life isotopes, implicitly and unequivocally encompassing the isotopes claimed in claim 1, for in vivo diagnostic immunoscintigraphy is also disclosed (see page 83 col. 2, paragraph 1).

Consequently the subject matter of present claims 1-9, 11-19, 22-28 is not novel over D1.

D2, document cited by the applicant, discloses (see discussion) the selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment scFv specific for the ED-B domain of fibronectin. Methods for antibody production in bacteria, purification and radiohalogenation with 211At via oxidation of a radiohalogenide and conjugation of the bifunctional halogen carrier are also described (see page 535; fig 1).

Since scFv is encompassed under the specific binding members of present application (as on description pages 33, 41; figures 1B, 3A, 3D, 5A, 5B).

Therefore the subject matter of present claims 1-4, 11-17, 22-24, 26, 27 is not new in view of D2.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/009733

D3 discloses the immunosclntigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer with a 123I L19.

Methods for antibody production in bacteria, purification and radiohalogenation with 123I via chloramine-T method and conjugation of the bifunctional halogen carrier are described (see page 572). Diagnostic and therapeutic approaches based on the use of radiolabelled L19(scFv)2 are also discussed (see discussion).

Since (scFv)2 is encompassed under the specific binding members comprising scFv as shown on description figure 1B of present application, therefore the subject matter of present claims 1-4, 11-19, 22-28 is not novel over D3.

D5 discloses the selective targeting of tumoral vasculature with radiolabelled antibody scFv (L19) to the ED-B domain of fibronectin with VH and VL sequences as claimed by present claim 1 (see seq ID. 19, seq ID 21). Radioiodinated and 211 At radiolabelled L19 and functionally equivalent variants are disclosed (see claims 11-13, 25-27; example 7; figure 16). Methods of treatment of angiogenesis related pathologies as tumours are also disclosed (see claims 32, 33; example 3; figure 15)

Consequently the subject matter of claims 1-4, 11-17, 22-24, 26, 27 is not novel over D5.

D6 discloses in vitro detection of B-fibronectin in tumour tissues with radiolabelled antibody L19 against ED-B of fibronectin (see example 4; claim 8). Therefore the subject matter of present claims 18-20 is not novel over D6.

Inventive step Article 33(3) PCT

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-28 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

The problem to be solved by the present application is the in vivo stability, clearance and performance in selective tumour targeting with antibodies (see page 4, lines 14-16).

The solution proposed is the use of radiolabelled formats of antibody (L19): scFv, miniantibody and IgG1 against the ED-B domain of fibronectin for the selective targeting of tumour vasculature in therapeutical and diagnosis uses as well as the method of producing the same.

Prior art document D2 already addresses the targeting of tumour vasculature with the use of scFv of antibody L19 to the ED-B domain of fibronectin (see discussion). The radiohalogenation with 211At via oxidation of a radiohalogenide and conjugation of the bifunctional halogen carrier are also described (see page 535; fig 1)

The difference between D2 and the subject matter of present application is the fact that other formats of L19 antibody recited in claims 5-9 as well as in vitro uses of the specific binding member as claimed by present claims 20, 21 are not explicitly mentioned in said document.

The skilled man would have tried with the expectation of success the use of a mini-antibody construct as described by D7 (see introduction, figure 1) as an effective format of antibody against the ED-B domain of fibronectin for the selective targeting of tumour vasculature in therapeutical and diagnosis uses. He would have been reinforced in his choice by the teaching of this document stating that "the antibody genes can be manipulated to construct a variety of new molecules" and "antibody fragment (SIP) are preferred to intact antibodies for the treatment of solid tumours because of their enhanced tissue penetration. Also their rapid clearance in vivo is ideal for diagnostic imaging" (see page 731, col. 1, paragraphs 1-2).

Moreover taking into account that the sequences of the specific binding member against the ED-B domain of fibronectin are well known in the prior art as i. e. previously discussed documents D1, D2 and D5 or from D4 (Sequence identities of HCDR1, HCDR2 and HCDR3 of the antibody to present seq. ID 1-3 and of LCDR1, LCDR2 and LCDR3 to present seq ID 4-6 respectively are depicted in table 1 of D4).

Consequently an inventive step for the subject matter of present claims 1-28 cannot be acknowledged.

Re Item VI
Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 03 076469	18/09/2003	11/03/2003	11/03/2002

The PCT application WO 03 076469 shows: Selective targeting of tumoral vasculature with radiolabelled (Tc, Re, In, Y, Lu isotopes preferred) different formats of antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin including mini-immunoglobulin and whole IgG1 comprising sequences as claimed by present claim 1 (see claims 1-9) and their radiolabelled conjugates (see claim 10) in particular exemplified with the preparation of radiolodinated derivatives (see page 29, line 30- page 30, line 28)

239
266

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/009733

Thus, it would be prejudicial to the novelty of the subject-matter of claims 1-9, 19, 20, 22-28 of the present application.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

2470
267

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación de registro de
una modificación

(regla PCT 92bis.1 e
Instrucciones Administrativas, sección 422)

A:

WALTON, Sean
Mowburn Ellis LLP
York house
23 Kingway
London Greater London WC2B 6HP
Gran Bretaña

Fecha de envío (día/mes/año):

26 de noviembre de 2004 (26.11.2004)

Referencia del solicitante o del agente:

SMVFP6235147

Solicitud Internacional N°:

PCT/EP 2004/009733

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Fecha de presentación (día/mes/año):

01 de septiembre de 2004 (01.09.2004)

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:

☒ el solicitante

☒ el inventor

☐ el agente

☐ el representante común

Nombre y dirección:

FRIEBE, Matthais
Antonienstr. 31
13403 Berlin
Alemania

País de
Nacionalidad
DE

País de
Residencia
DE

Teléfono N°:

Facsimil N°:

Telex N°:

2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación,
concerniente a:

☐ la persona

☐ el nombre

☒ la dirección

☐ la nacionalidad

☐ la residencia

Nombre y dirección:

FRIEBE, Matthias
Räuschstrasse 8
13509 Berlin
Alemania

País de
Nacionalidad
DE

País de
Residencia
DE

Teléfono N°:

Facsimil N°:

Telex N°:

3. Otras observaciones, si son necesarias:

4. Se envía una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina receptora

☐ las Oficinas concernientes designadas

☒ el Organismo de Búsqueda Internacional

☐ las Oficinas concernientes seleccionadas

☐ el Organismo del Examen Preliminar Internacional

☐ otros:

La Oficina Internacional de WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suiza

Funcionario autorizado:

Catherine TOLU (Fax 338 8995)

Facsimil N°: (41-22) 338.89.75

Teléfono N°: (41-22) 338 8958

Formulario PCT/IB/306 (marzo 1994)

006520222

297
268

**TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES**

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

**Notificación de registro de
una modificación**

(regla PCT 82bis.1 e
Instrucciones Administrativas, sección 422)

A:

WALTON, Sean
Mewburn Ellis LLP
York house
23 Kingsway
London Greater London WC2B 6HP
Gran Bretaña

Fecha de envío (día/mes/año):

28 de noviembre de 2004 (28.11.2004)

Referencia del solicitante o del agente:

SMWFP6235147

Solicitud Internacional N°:

PCT/EP 2004/009733

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

Fecha de presentación (día/mes/año):

01 de septiembre de 2004 (01.09.2004)

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:

☒ el solicitante

☒ el inventor

☐ el agente

☐ el representante común

Nombre y dirección:

CASTELLANI, Patrizia
Laboratory of Cell Biology
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rosanna Benzi 10
I-16132 Genova
Italia

País de
Nacionalidad
IT

País de
Residencia
IT

Teléfono N°:

Facsimil N°:

Telex N°:

2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a:

☐ la persona

☐ el nombre

☒ la dirección

☐ la nacionalidad

☐ la residencia

Nombre y dirección:

CASTELLANI, Patrizia
Laboratory of Cell Biology
Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
Largo Rosanna Benzi 10
I-16132 Genova
Italia

País de
Nacionalidad
IT

País de
Residencia
IT

Teléfono N°:

Facsimil N°:

Telex N°:

3. Otras observaciones, si son necesarias:

5. Se envía una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina receptora

☐ las Oficinas concernientes designadas

☒ el Organismo de Búsqueda Internacional

☐ las Oficinas concernientes seleccionadas

☐ el Organismo del Examen Preliminar Internacional

☐ otros:

La Oficina Internacional de WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suiza

Facsimil N°: (41-22) 338.88.75

Formulario PCT/IB/306 (marzo 1994)

Funcionario autorizado:

Catherine TOLU (Fax 338 8895)

Teléfono N°: (41-22) 338 9858

006521426

PATENT COOPERATION TREATY

269

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WALTON, Seán
Mawburn Ellis LLP
York House
23 Kingsway
London Greater London WC2B 6HP
United Kingdom

Date of mailing (day/month/year) 26 November 2004 (26.11.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference SMWFP8235147	
International application No. PCT/EP2004/009733	International filing date (day/month/year) 01 September 2004 (01.09.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address FRIEBE, Matthais Antonienstr. 31 13403 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address FRIEBE, Matthias Räuschstrasse 8 13509 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Catherine TOLU (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.89.75	Telephone No. (41-22) 338 8958

PATENT COOPERATION TREATY

270

151

RECORDS ENTD
 RECORDS SEEN
 DIARY ENTD
 PCT RENEWAL ENTD X
 ALREADY ENTD

from the INTERNATIONAL BUREAU

To:

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

WALTON, Seán
 Mewburn Ellis LLP
 York House
 23 Kingsway
 London Greater London WC2B 6HP
 United Kingdom

Date of mailing (day/month/year) 26 November 2004 (26.11.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference SMWFP6235147	
International application No. PCT/EP2004/009733	International filing date (day/month/year) 01 September 2004 (01.09.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address CASTELLANI, Patrizia Laboratory of Cell Biology Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro Largo Rosanna Benzi 10 I-16132 Genova Italy	State of Nationality IT	State of Residence IT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address CASTELLANI, Patrizia Laboratory of Cell Biology Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro Largo Rosanna Benzi 10 I-16132 Genova Italy	State of Nationality IT	State of Residence IT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Catherine TOLU (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.89.75	Telephone No. (41-22) 338 8955

244
271

Organismo de Examen Preliminar Internacional
Oficina de Patentes Europea
D-8098 Munich
ALEMANIA

31 de mayo de 2005

RESPUESTA A WO/ISA

Estimados señores

Solicitud de Patente Internacional N° PCT/EP 2004/009733

Solicitud de Patente Internacional N° PCT/EP 2004/009733

Solicitante: Philogen S.P.A. et al.

Nuestra Referencia: SMW/FP6235147

La presente es en respuesta al informe escrito de ISA fechado el 14 de febrero de 2005, y acompaña la solicitud de Examen Preliminar Internacional. La numeración de abajo sigue la utilizada en el informe escrito.

Ítem III: Claridad y apoyo

El examinador alega que la inclusión en la descripción del objeto no cubierto por las reivindicaciones lleva a dudar acerca del objeto para el cual se procura la protección y, en consecuencia, considera poco claras las reivindicaciones (artículo PCT 6).

De acuerdo con el artículo 6, las reivindicaciones deben definir el objeto para el cual se procura protección, estar escritas en forma clara y concisa y estar completamente apoyadas por la descripción. Las presentes reivindicaciones satisfacen estos criterios. En ninguna parte del PCT está establecido que el solicitante debe ser penalizado solamente porque ha elegido voluntariamente limitar el ámbito de protección procurada a un subconjunto de objetos revelados en la solicitud, tomada esta como un todo. Es más, la presencia potencial en las reivindicaciones de algunos otros objetos que, según se alega, no están relacionados con el objeto reivindicado no modifica de ninguna manera el texto de las reivindicaciones. Por ello, no puede alterar el ámbito de la protección procurada, la claridad y la conclusión de las reivindicaciones o el hecho de que de que las mismas están apoyadas por la descripción. En consecuencia, las reivindicaciones cumplen con los requerimientos del artículo PCT 6.

La referencia a "secuencias de dominio reveladas en Pini et al. (1988) J. Biol. Chem. 273: 21769 – 21776 es alegada para considerar poco clara la reivindicación 1.

Pini et al. (1988) estaba disponible para la persona experimentada en la materia antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud. La secuencia L 19 VH fue creada por Pini et al. (1988) mediante el uso de primers parcialmente degenerados y maduración de afinidad, para introducir mutaciones en las posiciones 1 – 33, 50 – 54 y 95 – 98 del CDR3 del dominio DP47 VH. Similarmente, el dominio L19VL fue creado introduciendo mutaciones en las posiciones 32, 50, 91, 93, 94 y 96 del CDR3 del dominio DPK22 Vk (página 21770, columna izquierda, párrafo 2, y página 21770, columna derecha, párrafo 5 a página 21771, columna izquierda, párrafo 3). Los aminoácidos específicos presentes en estas posiciones en las secuencias L19 VH y VL se aprecian en la tabla II de Pini et al. (1988). En consecuencia, las secuencias L19 VH y VL están unívocamente reveladas en Pini et al. (1988) y no existe posibilidad de interpretación con respecto a estas secuencias. Por ello, la incorporación de las secuencias de L19 VH y VL en la reivindicación 1 no puede volver poco clara esta reivindicación.

Adicionalmente, el examinador arguye que la descripción no aporta apoyo para un IgG1 rotulado con ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I o ^{211}At . No obstante, a la fecha de prioridad de la presente solicitud, en el estado de la técnica eran bien conocidos métodos de rotulación de anticuerpos con estos isótopos, y la persona experimentada en la materia debería conocer como rotular un IgG1 tal como está reclamado en la reivindicación 1. En consecuencia, la invención revela de una manera suficientemente clara y completa la invención a ser llevada a cabo por una

persona experimentada en la materia, y el objeto de las reivindicaciones 1 - 4 y 9 - 28 satisface los requerimientos del artículo PCT 5.

245
272

Las reivindicaciones 1 a 7, 9 y 11 a 13 son objetadas por carencia de apoyo porque se relacionan con una gran cantidad de compuestos/métodos. No obstante, una reivindicación no puede carecer de apoyo simplemente por ser considerada "irrazonablemente amplia" y no. existe requisito en el PCT para la solicitud de ejemplificar toda realización reivindicada individualmente en la invención. Lo que es importante es que los aspectos técnicos de la invención establecidas como esenciales en la descripción deben ser las mismas que las utilizadas para definir la invención en las reivindicaciones. El examinador ha fallado en demostrar que este no es el caso en la presente solicitud. Los aspectos esenciales de los compuestos/métodos de la presente invención están claramente establecidas en la reivindicación independiente 1, cuyas bases se pueden encontrar en la página 6, renglón 21 a página 7, renglón 22. En consecuencia, las reivindicaciones 1 a 7, 9 y 11 a 13 están apoyadas por la descripción.

También se alega que el objeto reclamado en las reivindicaciones 1 a 7, 9 y 11 a 13 no están revelados en la descripción de una manera suficientemente clara y concisa para ser llevada a cabo por una persona experimentada en la materia.

El examinador objeta, en particular, los términos "IgG1" y "péptido de enlace". No obstante, estos términos son bien conocidas en el estado de la técnica a la fecha de prioridad de la solicitud. Sin embargo, por motivos de claridad, una definición de IgG1 se puede apreciar en la presente solicitud en la página 16, renglones 16 a 19. Además, en la página 35, renglón 13 a página 36, renglón 19 de la presente solicitud se revela como producir las moléculas IgG1 de la presente invención. Métodos de rotulación de anticuerpos con ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I o ^{211}At , oxidar un halogenuro seleccionado de ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I o ^{211}At y conjugar un vehículo bifuncional activado para obtener un residuo de lisina o cisteína o un término N de un anticuerpo es bien conocido para la persona experimentada en la materia a la fecha de prioridad de esta solicitud. Además, en página 27, renglón 18 a página 29, renglón 13 se describen varios métodos para rotular SIP con ^{123}I , ^{124}I o ^{125}I . El examinador no proveyó fundamentos concretos para creer que la invención no puede ser llevada a cabo por la persona experimentada en la materia en todo el ámbito de compuestos/métodos reivindicados. En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 a 7, 9 y 11 a 13 satisfacen el artículo PCT 5.

Además, el privilegiado con una patente tiene el derecho a un ámbito de protección razonable en concordancia con la contribución que hizo al estado de la técnica. Limitar las reivindicaciones a solo aquellos compuestos, métodos y usos exhibidos en los ejemplos y listados de secuencias de la presente solicitud, como es sugerido por el examinador, limitaría injustamente el ámbito de la vía de protección según la real contribución efectuada al estado de la técnica por la invención. Si esto fuera otorgado, permitiría a la persona experimentada en la materia evadir la protección de la patente haciendo uso de la real enseñanza de la presente solicitud. Es cuestión de mera rutina hacer un anticuerpo IgG1 y emplear un péptido de enlace. En consecuencia, no estamos de acuerdo en que las reivindicaciones deban ser limitadas en este aspecto.

El examinador alega además que las reivindicaciones 14 - 21 intentan definir la invención en términos de un resultado a obtener y, por ello, carecen de claridad.

Las reivindicaciones 14 - 21 se refieren a métodos para la producción miembros de enlace específicos de las reivindicaciones 1 - 10 y las frases objetadas son simples pasos a ser llevados a cabo en tales métodos. Estos pasos de método no son un resultado a obtener. El resultado a obtener es la producción de miembros de enlace específicos y las reivindicaciones 14 - 21 se refieren a pasos para obtener tal resultado. Además, estas reivindicaciones son dependientes de las reivindicaciones 11 a 13. El examinador no objetó las reivindicaciones 11 a 13 como un intento de definir el método de la invención solo en términos de un resultado a ser obtenido.

En todo caso, se pueden permitir las reivindicaciones en las que la invención está definida en términos de un resultado a ser obtenido si la invención solo puede ser definida en tales términos o no puede ser definida más precisamente en otros términos sin restringir indebidamente el ámbito de las reivindicaciones, en tanto el resultado sea tal que, sin una debida experimentación, sea directa y positivamente verificada por ensayos o procedimientos adecuadamente especificados en la descripción o conocidos por la persona experimentada en la materia. A los fines de precisar más precisamente como los pasos de método objetados

246
273

pueden ser llevados a cabo puede restringir indebidamente el ámbito de las reivindicaciones. Todas las frases objetadas por el examinador se refieren a metodologías bien conocidas y entendidas por la persona experimentada en la materia. La persona experimentada en la materia puede determinar directa y positivamente cuándo tales pasos pueden, a lo menos, ser llevados a cabo utilizando sus conocimientos generales. Además, a lo menos una manera de ejecutar cada uno de los siguientes pasos está dada en la presente solicitud: "expresar el ácido nucleico que codifica el miembro de enlace específico" (página 33, renglón 25 a página 38, renglón 9) y "purificar el miembro de enlace específico" (página 38, renglón 11 a página 38, renglón 8). En consecuencia, las reivindicaciones 14 a 21 son claras y concisas, satisfaciendo así los requisitos del artículo PCT 6.

Estas son reivindicaciones perfectamente normales, en un formato que fuera concedido por EPO en muchas patentes.

Ítem V Novedad

D1 y D6 revelan compuestos rotulados con ^{125}I . De acuerdo con la actual reivindicación 1, el objeto de la presente solicitud comprende uno de los siguientes isótopos: ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I o ^{211}At . El isótopo ^{125}I no está reclamado en ninguna reivindicación de la presente solicitud, con lo cual las reivindicaciones de la solicitud no comprenden los compuestos revelados en D1 y D2.

D2 y D5 revelan compuestos scFv rotulados con ^{211}At . D3 revela compuestos L19(scFv) rotulados con ^{125}I . De acuerdo con la reivindicación 1, el objeto de la presente solicitud comprende miembros de enlace específicos con formato de mini-inmunoglobulina o IgG1. Los miembros de enlace específicos de formato scFv o (scFv)₂ no son reclamados en ninguna reivindicación de la presente solicitud, por lo que tanto D2 como D3 no revelan ningún compuesto que esté incluido en alguna reivindicación de esta solicitud.

En consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones es novedoso con respecto a D1, D2, D3, D5 y D6.

Actividad Inventiva

El examinador arguye que las reivindicaciones no son inventivas con respecto a una combinación de D2 y D7.

El problema a resolver con respecto a D2 es proveer agentes alternativos de bombardeo selectivo de tumores ED-B. Los inventores encontraron, sorprendentemente, que el miembro de enlace específico de la presente invención es adecuado para estos propósitos.

Se deben tomar en consideración una cantidad de factores cuando se diseña un agente de bombardeo selectivo de tumores. Por ejemplo, la afinidad de enlace del agente con respecto al objetivo afecta la biodistribución del agente, su tiempo de retención y la cantidad absoluta del agente enlazado con el objetivo. Adicionalmente, el tamaño del agente afecta la biodistribución, el tiempo de circulación y la velocidad de excreción. Para un diagnóstico/terapia exitoso, la biodistribución del agente requiere cubrir a lo menos el antígeno objetivo. La remoción debe ser lo suficientemente rápida como para permitir encontrar la ventana diagnóstica o terapéutica pero lo suficientemente lenta como para permitir el enlace del agente con el objetivo. Debe haber suficiente agente como para enlazarlo con el objetivo y permitir un diagnóstico exacto o una terapia efectiva peor no tanto como para que la imagen no sea clara o que ocurran efectos laterales indeseados en la terapia. La vida media del isótopo seleccionado debe así ajustarse a la biodistribución del agente, a los fines de obtener un diagnóstico apropiado o una ventana terapéutica.

Por ello, debe ser diseñado un agente de enlace cuya afinidad de enlace, tamaño y vida media de radionucleido provea el balance correcto entre biodistribución, tiempo de retención y cantidad absoluta de agente de enlace con el objetivo, suministrando también un diagnóstico apropiado o una ventana terapéutica.

Por consiguiente, la combinación de objetivo, afinidad de enlace, radioisótopo y tamaño del agente que sea un agente de enlace efectivo y selectivo con un tumor ED-B no es obvio y las combinaciones exitosas no pueden ser identificadas sencillamente mediante combinaciones del estado de la técnica. En otras palabras, ninguno de los documentos citados por el examinador,

tanto solos como combinados, hacen obvio el objeto de las reivindicaciones para la persona experimentada en la materia.

247
274

Además, D7 no enseña acerca del uso del formato SIP para agentes de bombardeo de enlace de tumores ED-B. En D7, página 736, segunda columna, penúltima frase antes de la sección de referencias, está establecido "en este contexto, la adición de un enlace disulfuro en el *linker* entre VH y VL (SIP-cla), aunque incrementa la estabilidad, puede impartir la movilidad relativa de los dos dominios de enlace y pueden eventualmente reducir la afinidad". Esto significa que D7 no enseña de ninguna manera que el formato SIP siempre produce un agente útil para propósitos diagnósticos o terapéuticos. Puede muy bien ser que el uso de este formato resulte en una afinidad disminuida, de manera que el agente resultante ya no es útil como agente de bombardeo. En consecuencia, la persona experimentada en la materia no está motivada para combinar D2 con D7 para arribar a las mini-inmunoglobulinas de la presente invención, como es sugerido por el examinador.

Más aún, si el antígeno está presente en células malignas, el agente de bombardeo necesita penetrar el tejido a los efectos de tener acceso al objetivo. No obstante, si el antígeno está sobreexpresado en células endoteliales angiológicas que constituyen la pared de un nuevo vaso sanguíneo, el objetivo es más fácil de acceder, resultando menos importante una buena penetración de los tejidos. Como la fibronectina ED-B está expresada primariamente por vasos sanguíneos angiológicos (ver, por ejemplo, D2), la persona experimentada en la materia no tiene expectativas, antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud, de que la selección de un formato de anticuerpo con capacidad de penetración potencialmente mejorada (por ejemplo, SIP, ver D7) puede ser de particular uso como un agente de bombardeo selectivo de enlace ED-B de tumores.

Como resultado de los muchos factores interactuantes, la persona experimentada en la materia puede requerir las debidas experimentaciones sin expectativas razonables de éxito a los efectos de arribar al objeto de la presente solicitud. En consecuencia, la actividad inventiva debe ser admitida para el juego completo de las reivindicaciones.

En lo que respecta a las reivindicaciones 22 a 28, el examinador alega que, a la luz de D8 y D9, no todos los miembros de enlace específicos reclamados pueden tener expectativas creíbles de ser útiles en diagnóstica y terapia. Por ello, dice que la actividad inventiva no puede ser admitida para estas reivindicaciones.

Como se explica arriba, todas las reivindicaciones son inventivas, en particular, las reivindicaciones 22 a 28 son dependientes con respecto a las reivindicaciones inventivas 1 a 10. En consecuencia, las reivindicaciones 22 a 28 son también inventivas.

Además, D8 establece que ^{211}At posee un gran potencial de uso en terapia de bombardeo de radionucleidos. Aunque, como hace notar el examinador, ^{211}At es alegado como inadecuado para la planificación de dosificaciones, esto no lo inhibe de ser utilizado como agente de diagnóstica/terapia. La distribución de la radioactividad de astatina en humanos puede ser estimada mediante el uso de isótopos radioactivos de otros halógenos, siempre que se utilice el mismo método de rotulación (D8, página 386, columna izquierda, párrafo 3), pudiéndose utilizar otros halógenos para predecir la dosificación apropiada de ^{211}At para su uso en terapia o diagnóstica.

D9 describe el uso de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos rotulados con ^{211}At en radioterapia y establece que la contribución de muerte de células *in vitro* con ^{211}At sin enlazar puede variar considerablemente cuando se utiliza fragmentos de anticuerpos rotulados con ^{211}At . El pasaje no menciona la actividad *in vivo* o *in vitro* de los fragmentos de anticuerpos rotulados. Además, D9, página 1450, columna derecha, párrafo 4, describe como un anticuerpo monoclonal rotulado con ^{211}At del dominio de fibronectina 11 – 12 de la molécula de tenascina es efectiva en la terapia de tumores y en la página 1453, columna izquierda, párrafo 1, establece que la radioterapia de bombardeo usando compuestos rotulados con ^{211}At puede ser un enfoque útil para el tratamiento del cáncer.

En consecuencia, D8 y D9 no enseña acerca de los compuestos inventivos de la presente invención que son útiles como agentes de diagnóstica/terapia.

Ítem VI Otros documentos publicados

Nosotros entendemos que la presente solicitud tiene derecho a su reivindicación de prioridad y, por ello, WO 03/075469 no pertenece al estado de la técnica.

Para finalizar, no obstante, hacemos notar que los compuestos de la presente solicitud deben comprender uno de los siguientes isótopos: ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I o ^{211}At y que la WO 03/076469 no revela ninguno de tales compuestos.

Saludo de rigor

Sean Walton
AGENTE DESIGNADO
MEWBURN ELLIS LLP

Contacto personal:
por teléfono: +44 1223 420383
por e-mail: sean.walton@mewburn.com

GLBN/glb/jeg

248
275

249
276

International Preliminary Examining Authority
European Patent Office
D-80298 Munich
GERMANY

31 May 2005

RESPONSE TO THE WO/ISA

Dear Sirs

International Patent Application No. PCT/EP2004/009733
Applicant: Philogen S. P. A. et. al.
Our Ref: SMW/FP6235147

This is in response to the written opinion of the ISA dated 14 February 2005, and accompanies the demand for international preliminary examination. The numbering below follows that used in the written opinion.

Item III Clarity and Support

The examiner alleges that the inclusion in the description of subject matter not covered by the claims leads to doubt over the matter for which protection is sought and thereby renders the claims unclear (Article 6 PCT).

According to Article 6 PCT, the claims should define the matter for which protection is sought, be written in a clear and concise manner and be fully supported by the description. The present claims satisfy these criteria. At no point in the PCT does it state that the applicant should be penalised merely because he may have voluntarily chosen to limit the scope of protection sought to a sub-set of the subject matter disclosed in the application as a whole. Moreover, the potential presence in the claims of some other subject matter that allegedly does not relate to claimed subject matter does not change the wording of the claims in any way. Thus, it cannot alter the scope of protection sought, the clarity and conclusion of the claims or the fact that they are supported by the description. Therefore, the claims meet the requirements of Article 6 PCT.

The reference to "domain sequences being disclosed in Pini et al (1998) J. Biol. Chem. 273:21769-21776" is also alleged to render claim 1 unclear.

Pini et al. (1998) was available to the skilled person before the priority date of the present application. The L19 VH sequence was created in Pini et al. (1998) by using partially degenerate primers and affinity maturation to introduce mutations in positions 31-33, 50-54 and 95-98 of CDR3 of the DP47 VH domain. Similarly, the L19 VL domain was created by introducing mutations into positions 32, 50, 91, 93, 94 and 96 of the DPK22 Vk domain CDR3 (page 21770, left-hand column, paragraph 2, and page 21770, right-hand column paragraph 5 to page 21771, left-hand column, paragraph 3). The specific amino acids present in these positions in the L19 VH and VL sequences are shown in table II of Pini et al. (1998). Thus, the L19 VH and VL sequences are unequivocally disclosed in Pini et al.

(1998) and there is no room for interpretation with regard to these sequences. Therefore, incorporating the sequences of L19 VH and VL into claim 1 cannot render this claim unclear.

Additionally, the examiner argues that the description does not give support for a whole IgG1 labelled with ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I or ^{211}At . However, at the priority date of the present application, methods of labelling antibodies with these isotopes were well known in the art and the skilled person would know how to label an IgG1 as claimed in claim 1. Thus, the description discloses the invention in a manner sufficiently clear and complete for the invention to be carried out by a person skilled in the art and the subject matter of claims 1-4 and 9-28 satisfies the requirements of Article 5 PCT.

Claims 1 to 7, 9 and 11 to 13 are objected to for lack of support because they relate to very large numbers of compounds/methods. However, a claim cannot lack support simply because it is considered to be "unreasonably broad" and there is no requirement in the PCT for the application to exemplify every single claimed embodiment of the invention. What is important is that technical features stated in the description to be essential features of the invention must be the same as those used to define the invention in the claims. The examiner has failed to demonstrate that this is not the case in the present application. The essential features of the compounds/methods of the present invention are clearly set out in independent claim 1, basis for which can be found on page 6, line 21 to page 7, line 22. Thus, claims 1 to 7, 9 and 11 to 13 are supported by the description.

The subject matter claimed in claims 1 to 7, 9 and 11 to 13 is also alleged not to be disclosed in the description in a manner sufficiently clear and concise to be carried out by a person skilled in the art.

In particular, the examiner objects to the terms "IgG1" and "linker peptide". However, these terms were well known in the art at the priority date of the application. Nevertheless, for the sake of clarity, a definition of IgG1 is given on page 16, lines 16 to 19, of the present application. Furthermore, page 35, line 13 to page 36, line 19 of the present application discloses how to produce IgG1 molecules of the present invention. Methods of labelling antibodies with ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I or ^{211}At , oxidising a halogenide selected from ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I or ^{211}At and conjugating an activated bifunctional halogen carrier to a lysine or cysteine residue or N-terminus of an antibody were well known to the skilled person at the priority date of this application. Moreover, page 27, line 18 to page 29, line 13 describe various methods for labelling SIP with ^{125}I , ^{131}I and ^{124}I . The examiner has not provided any concrete grounds for believing that the invention cannot be carried out by the skilled person within the whole range of compounds/methods claimed. Thus, the subject matter of claims 1 to 7, 9 and 11 to 13 satisfies Article 5 PCT.

Furthermore, the patentee is entitled to a fair scope of protection in keeping with the contribution he has made to the art. To limit the claims to only those compounds, methods and uses given in the examples and sequence listings of the present application, as suggested by the examiner, would unfairly limit the scope of protection way below the actual contribution made to the art by the invention. If this were done, it would allow the skilled person easily to circumvent the patent protection while still making use of the actual teaching of the present application. It is a matter of mere routine to make an IgG1 antibody and to employ a linker peptide. Thus, we do not agree that the claims should be limited in this way.

The examiner also alleges that claims 14-21 attempt to define the invention in terms of a result to be achieved and therefore lack clarity.

Claims 14-21 relate to methods for producing the specific binding members of claims 1 to 10 and the phrases objected to by the examiner are simply steps to be carried out in such methods. These method steps are not a result to be achieved. The result to be achieved is the production of specific binding members and claims 14-21 refer to steps that provide for such a result to be achieved. Moreover, these claims are dependent on claims 11 to 13. The examiner has not objected to claims 11 to 13 as attempting to define the invention in terms of a result to be achieved. Thus, claims 14 to 21 do not attempt to define the method of the invention solely in terms of a result to be achieved.

In any case, claims wherein the invention is defined in terms of a result to be achieved may be allowed if the invention either can only be defined in such terms or cannot otherwise be defined more precisely without unduly restricting the scope of the claims, provided the result is one which can, without undue experimentation, be directly and positively verified by tests or procedures adequately specified in the description or known to the person skilled in the art. To specify more precisely how the objected-to method steps might be carried out would be to unduly restrict the scope of the claims. All the phrases objected to by the examiner refer to methodology well known to and understood by the person skilled in the art. The skilled person can determine directly and positively whether such steps have been carried out using his general knowledge. Moreover, at least one way of doing each of the following steps is given in the present application: "expressing nucleic acid encoding the specific binding member" (page 33, line 25 to page 36, line 9) and "purifying the specific binding member" (page 36, line 11 to page 38, line 8). Thus, claims 14 to 21 are clear and concise and satisfy the requirements of Article 6 PCT.

These are perfectly normal claims in a format that has been granted by the EPO in many patents.

Item V Novelty

D1 and D6 disclose compounds labelled with ^{125}I . According to current claim 1, the subject matter of the present application comprises one of the following isotopes: ^{70}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I or ^{211}At . The isotope ^{125}I is not claimed in any claim of the present application and so the claims of this application do not encompass the compounds disclosed in either D1 or D6.

D2 and D5 disclose scFv labelled with ^{211}At . D3 discloses L19 (scFv)₂ labelled with ^{125}I . According to claim 1, the subject matter of the present application comprises specific binding members of the mini-immunoglobulin or IgG1 format. Specific binding members of the scFv or (scFv)₂ format are not claimed in any claim of the present application and so neither D2 nor D3 discloses any compound that may be encompassed by any claim of this application.

Therefore the subject matter of the present claims is novel over D1, D2, D3, D5 and D6.

Inventive Step

The examiner argues that the claims are not inventive over a combination of D2 and D7.

The problem to be solved over D2 is to provide alternative selective ED-B binding tumour targeting agents. The inventors have surprisingly found that the specific binding members of the present invention are suitable for this purpose.

A number of factors must be taken into account when designing a selective tumour targeting agent. For example, the binding affinity of the agent towards the target has an impact on the blood distribution of the agent, its retention time and the absolute amount of agent bound to the

target. Additionally, the size of the agent has an impact on its biodistribution, circulation time and excretion rate. For successful diagnosis/therapy, the biodistribution of the agent needs to cover at least that of the target antigen. Clearance has to be fast enough to allow the appropriate diagnostic or therapeutic window to be met but slow enough to allow for sufficient binding of the agent to the target. There must be sufficient agent bound to the target to allow accurate diagnosis or effective therapy but not so much as to make imaging unclear or for unwanted side-effects of therapy to occur. The half-life of the chosen radioisotope must also match the biodistribution of the agent in order to give an appropriate diagnostic or therapeutic window.

Thus, a binding agent has to be designed whose binding affinity, size and radionuclide half-life provide the right balance between biodistribution, retention time and absolute amount of agent binding to the target while also providing an appropriate diagnostic or therapeutic window.

Therefore, the combinations of target, binding affinity, radioisotope and size of agent that will be effective selective ED-B binding tumour agents are not obvious and successful combinations cannot be identified simply by combining prior art. In other words, none of the documents cited by the examiner either alone or in combination makes the subject matter of the claims obvious to the skilled person.

Furthermore, D7 teaches away from the use of the SIP format for ED-B binding tumour targeting agents. In D7 on page 736, second column, penultimate sentence before the References section, it is stated "In this context, the addition of a disulphide bond in the linker between VH and VL (SIP-cys), though increasing stability, can impair the relative mobility of the two binding domains and may eventually reduce the affinity." This means that D7 by no means teaches that the SIP format always yields a useful agent for diagnostic or therapeutic purposes. It may well be that using this format leads to decreased affinity, so that the resulting agent is no longer useful as a targeting agent. Thus, the skilled person would not have been motivated to combine D2 with D7 to arrive at the mini-immunoglobulins of the present invention, as suggested by the examiner.

Moreover, if the antigen is present on malignant cells, the targeting agent needs to penetrate the tissue in order to have access to the target. However, if the antigen is overexpressed on angiogenic endothelial cells building up the wall of a new blood vessel, the target is easier to access and good tissue penetration is less important. As ED-B fibronectin is expressed primarily by angiogenic blood vessels (see, e.g., D2), the skilled person would have no expectation before the priority date of the present application that selection of an antibody format with potentially enhanced penetration capabilities (e.g. SIP, see D7) would be of particular use as an ED-B binding selective tumour targeting agent.

As a result of the many interacting factors, the person skilled in the art would need to do undue experimentation without reasonable expectation of success in order to arrive at the subject matter of the present application. Consequently inventive step has to be acknowledged for the entire claim set.

In relation to claims 22 to 28, the examiner alleges that, in the light of D8 and D9, not all of the claimed specific binding members can credibly be expected to be useful in diagnosis or therapy. Thus, he says that inventive step cannot be acknowledged for these claims.

As explained above, all of the claims are inventive. In particular, claims 22 to 28 are dependent upon inventive claims 1 to 10. Thus claims 22 to 28 are also inventive.

Furthermore, D8 states that ^{211}At has great potential for use in targeted radionuclide therapy. Although, as pointed out by the examiner, ^{211}At is allegedly unsuitable for dose planning, this does not prevent it from being used as a therapeutic/diagnostic agent. The astatine radioactivity distribution in humans can be estimated by using radioactive isotopes of other halogens provided that the same labelling method is used (D8, page 386, left-hand column, paragraph 3) and so other halogens can be used to predict the appropriate dose of ^{211}At for use in therapy or diagnosis.

D9 describes the use of ^{211}At -labelled antibodies and antibody fragments in radiotherapy and states that the contribution of cell kill *in vitro* from unbound ^{211}At can vary considerably when using ^{211}At labelled antibody fragments. This passage does not mention the activity of the labelled antibody fragments *in vivo* or *in vitro* and so gives no indication of their effectiveness as therapeutic/diagnostic agents. Furthermore, D9, page 1450, right hand column, paragraph 4 describes how a ^{211}At -labelled monoclonal antibody to fibronectin domains 11-12 of the tenascin molecule is effective in tumour therapy and page 1453, left-hand column, paragraph 1 states that targeted radiotherapy using ^{211}At -labelled compounds may be a useful approach for cancer treatment.

Thus, D8 and D9 do not teach against the inventive compounds of the present invention being useful as therapeutic/diagnostic agents.

Item VI Other Published Document

We believe the present application is entitled to its priority claim and thus WO 03/076469 is not prior art.

For the sake of completeness, however, we note that the compounds of the present application must comprise one of the following isotopes: ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I or ^{211}At and that WO 03/076469 does not disclose any such compounds.

Yours faithfully

Seán Walton
APPOINTED AGENT
MEWBURN ELLIS LLP

You can contact me personally:
By telephone on +44 1223 420383
By e-mail at sean.walton@mewburn.com

GLB/glb/jeg

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

254
281

PCT
Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente SMWFP6235147	PROCEDER Ver notificación del envío del informe de búsqueda internacional (formulario PCT/ISA/220), así como, en tanto corresponda, el siguiente punto 5.	
Referencia Internacional PCT/EP 2004/009733	Fecha de presentación Internacional 01.09.2004	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 10.09.2003
Solicitante PHILOGEN S.P.A.		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este Informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 2 hojas.

☒ Además se adjunta una copia de cada uno de los antecedentes del estado de la técnica mencionados en este Informe

1. Fundamentos del Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda Internacional, en tanto no se indique otra cosa en este punto, fue llevada a cabo en el idioma en que se basa la solicitud Internacional presentada.

☐ La búsqueda Internacional fue llevada a cabo basada sobre una traducción de la solicitud Internacional presentada ante el organismo (regla 23.1 b)).

b. ☒ Con respecto a los nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud Internacional, ver campo N° 1

2. ☐ Determinadas reivindicaciones no eran investigables (ver campo II).

3. ☐ Escasa uniformidad de la invención (ver campo III).

4. Con respecto al título de la invención,

☐ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

☒ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

**BOMBARDEO DE VASCULATURA TUMORAL UTILIZANDO ANTICUERPOS RADIOROTULADOS L19
ANTAGONISTAS DE FIBRONECTINA ED-B**

5. Con respecto al resumen,

☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.

☐ el texto fue establecido por el organismo de acuerdo con la regla 36.2 b) de la versión indicada en el campo III. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo en el transcurso de un mes a partir de la fecha del envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las ilustraciones

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las Ilustraciones: figura N° 1 .

☐ sugerida el solicitante.

☒ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.

☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☐ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2004/006236

Campo I: Secuencia(s) de nucleótidos y/o aminoácidos (continuación del ítem 1.b de la hoja 1)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos dada a conocer en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basado sobre:
 - a. Tipo de material
 - ☒ un listado de secuencias
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia(s)
 - b. Forma del material
 - ☒ en forma escrita
 - ☒ en forma legible por computadora
 - c. Momento de presentación o suministro
 - ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
 - ☐ presentada en forma legible por computadora junto con la solicitud internacional
 - ☒ suministrada subsiguientemente a este organismo a los propósitos de la búsqueda
2. ☐ Adicionalmente, en el caso de que hubieran sido presentadas o suministradas una o más versiones o copias de un listado de secuencias y/o tabla relacionada con la misma, se debe suministrar la declaración requerida de que la información de la copia subsiguiente o adicional es idéntica a la de la solicitud tal como fue presentada o no supera su ámbito de la misma, según corresponde.
3. Comentarios adicionales:

256
283

INF RME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Referencia Internacional PCT/EP 2004/009733
A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD		
IPC7 A61K51/10 A61P35/00		
Según la clasificación internacional de patentes (IPK) o la clasificación internacional la IPK		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS		
Material mínimo investigado (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación) IPc 7 A61K		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas) EPO-internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de las piezas consideradas	Con referencia a reivindicación N°
X	BORSIL ET AL.: "Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEM YORK, NY, US VOL. 102, nº 1 1 de noviembre de 2002 (2002.11.01), páginas 75 – 85 XP002252051 ISSN: 0020-7136 página 76, figuras 1, 4 página 84 página 77, columnas 2, párrafo 2 ver discusión	1 – 9 11 – 19 22 – 28
☒ Se pueden escoger otras publicaciones en la continuación del campo C		☒ Ver familia de patentes en el anexo
"A"	Categorías particulares indicadas en publicaciones que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante	"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa
"B"	documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional	"X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva
"L"	publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)	"Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista
"O"	publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones	"A" publicación que es miembro de la misma familia
"P"	publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada	
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 3 de febrero de 2005		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 14.02.2005
Nombre y Código Postal de ISA European Patent Office – P.B. 5818 Patenteaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-2040; Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3018		Funcionario Apoderado Gonzalez Ramon, N

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2004/009733

C. (continuación) ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de las piezas consideradas	Con referencia a reivindicación N°
X	DEMARTIS S. ET AL.: "Selective targeting of tumor neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectine" EUR. J. NUCL. MED. vol. 28 N° 4, abril 2001 (2001-04), páginas 534 – 539 XP001184113 mencionado en la solicitud resumen páginas 535 – 536, figura 1 ver discusión	1 – 4 11 – 17 22 – 24 26, 27
X	SANTIMARIA ET AL.: "Immunocytographic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer" CLIN. CANCER RES., vol. 9 febrero 2003 (2003-02), páginas 571 – 579, XP001184112 resumen página 572, columna 1, párrafo 3 – página 572, columna 2, párrafo 2 ver discusión	1 – 9 11 – 19 22 – 28
X	WO 03/055917 A (BERNDORFF DIETMAR; DINKELBORG LUDGER (DE); HILGER CHRISTOPH-STEPAN) 10 de julio de 2003 (2003.07.10) página 8, reivindicaciones 5, 6, 14, 15, página 16, ejemplo 5	1 – 4, 9 11 – 28
P.X	WO 03/076469 A (SCHERING AG; FRIEBE MATTIAS (DE); HILGER CHRISTOPH-STEPAN (DE)) 18 de septiembre de 2003 (2003.09.18); páginas 29 – 30, reivindicaciones 1 – 10, 15 – 26, figura 1	1 – 9 11 – 28
X	WO 01/82800 A (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE) 30 de agosto de 2001 (2001.08.30) ver secuencia id 19, secuencia ID 21; reivindicaciones 11 – 13, 25 – 27, 32 – 33; figuras 6, 15, 16; ejemplos 3, 7	1 – 4 11 – 17 22 – 24 26 – 27
X	WO 01/98599 A (CASTELLANI PATRIZIA; ZARDI LUCIANO (IT); PHILOGEN S.P.A. (IT); ZIJL) 20 de diciembre de 2001 (2001.12.20) páginas 32 – 34, reivindicación 8	18 – 20
Y	MARTY C ET ALL "Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments bonding to the ED-B domain of the B-Isoform of fibronectin in Pichia pastoris" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, US vol 21, N° 1, febrero 2001 (2001-02); páginas 156 – 164, XP002242574 ISSN: 1046-5928	1 – 28
X	página 156, columna 2, figura 1 página 159, columna 2, párrafo 3 – página 160, columna 1, párrafo 1	18 – 20
Y	LI ERQIU ET AL.: "Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP)" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB vol 10, N° 6, 1997, páginas 731 – 736 XP 002252049 ISSN: 0269-2139 ver discusión resumen; figura 1	1 – 28
Y	ORLOVA ANNA ET AL.: "Comparative biodistribution of the radiohalogenated (BR, I and AT) antibody A33. Implications for in vivo dosimetry" CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol 17, N° 4, páginas 385 – 396 XP008027054 ISSN: 1084-6785 resumen	22 – 28

258
285

C. (continuación) ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de las piezas consideradas	Con referencia a reivindicación N°
Y	ZALUTSKY M R ET AL: "Astatine -211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 6, septiembre 200 (200-09), páginas 1433 – 1485, XP000949215 ISSN: 1381-8128 página 1437, columna 2 página 1448, columna 2 – página 1449, columna 1	22 – 28
A	PINI A ET AL: "Design and use of a phage display library: human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US vol. 2743, N° 34, 21 de agosto de 1998 (1998.08.21), páginas 21768 – 21776, XP002124781 ISSN: 0021-9258 mencionado en la solicitud resumen; tabla 2	1 – 28
T	MATTER C. M. ET AL.: "Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extradomain B of fibronectin" CIRCULATION RESEARCH, vol. 85, 2094, páginas 1225 – 1233, XP008042282 ver discusión página 1226, columna 1, párrafo 4	1 – 9 11 – 19 22 – 28

259
286

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL					Referencia Internacional	
Detalle de publicaciones que pertenecen a la misma familia de patentes					PCT/EP 2004/009733	
Documentos de Patente citados en el Informe de Búsqueda			Fecha de la publicación		Miembros de la familia de patentes	
WO	03055917	A	10.07.2003	AU	2003210149 A1	15.07.2003
				BR	0306715 A	28.12.2004
				CA	2468081 A1	10.07.2003
				WO	03055917 A2	10.07.2003
				EP	1461360 A2	29.09.2004
				US	2004001790 A1	01.01.2004
WO	03076469	A	18.09.2003	CA	2478414 A1	18.09.2003
				EP	1463297 A2	08.12.2004
				WO	03076469 A2	18.09.2003
WO	0162800	A	30.08.2001	AU	4243201 A	03.09.2001
				CA	2400622 A1	30.08.2001
				WO	0162800 A1	30.08.2001
				EP	1259548 A1	27.11.2002
				JP	2003524018 T	12.08.2003
				US	2003176663 A1	18.09.2003
WO	0196599	A	20.12.2001	AU	8182401 A	24.1.2001
				WO	0196599 A2	20.12.2001

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

260
287

Del ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

PCT

A
ver formulario PCT/ISA/220

INFORME ESCRITO
DEL ORGANISMO DE
BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(regla PCT Nº 43bis.1)

Fecha de envío (día/mes/año)
ver formulario PCT/ISA/210 (hoja 2)

Referencia del Solicitante o Agente
ver formulario PCT/ISA/220

PROCEDER
Ver abajo, punto 2

Referencia Internacional PCT/EP 2004/009733	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 01.09.2004	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 10.09.2003
--	---	--

Clasificación Internacional de Patentes (IPK) o clasificación nacional e IPK
A61K31/10, A61P35/00

Solicitante
PHILOGEN S.P.A.

1. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:

☒ Campo Nº I Fundamento del Informe

☐ Campo Nº II Prioridad

☒ Campo Nº III No realización de dictamen alguno sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial

☐ Campo Nº IV Falta de uniformidad de la invención

☒ Campo Nº V Declaración fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución.

☒ Campo Nº VI Documentos específicos expuestos

☐ Campo Nº VII Fechas específicas de la solicitud internacional

☐ Campo Nº VIII Observaciones específicas a la solicitud internacional

2. PROCEDER

Quando se solicita un Examen Preliminar Internacional, este informe es válido como informe escrito del organismo encargado de la búsqueda internacional ("IPEA"); esto no es así cuando, según la regla 88.1bis(b), el solicitante elige otro organismo distinto a este como IPEA y el IPEA elegido informó a la Oficina Internacional que los informes escritos de este organismo de búsqueda internacional no serán reconocidos.

Quando este informe es válido como informe escrito de IPEA, tal como está previsto arriba, el solicitante es intimado a presentar ante IPEA una posición por escrito, y cuando corresponde, modificaciones, en el plazo de 3 meses a partir de la fecha en la que fue remitido el formulario PCT/ISA/220 o en el plazo de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde.

Para otras opciones, ver formulario PCT/ISA/220.

3. Para otros detalles, ver las instrucciones del formulario PCT/ISA/220.

Nombre y Dirección Postal del ISA Oficina de Patentes Europeas, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario Autorizado Gonzalez Ramon, N Tel: +31 70 340 3466
---	---

**INFORME ESCRITO DEL
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Referencia Internacional
PCT/EP 2004/008733

268
288

Campo Nº I	Fundamento del Informe
------------	------------------------

1. Con respecto al idioma, el informe fue confeccionado, basado sobre la solicitud internacional, en el idioma en que fue presentada, en tanto en este punto no se indique otra cosa.
☐ El informe está basado sobre una traducción del idioma original al siguiente idioma, el que se trata del idioma de la traducción presentada a los efectos de la búsqueda internacional (según las reglas 12.3 y 23.1 b)).
2. Con respecto a la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y requerida para la invención reivindicada, el informe fue confeccionado sobre la siguiente base:
 - a. Tipo de material
☒ listado de secuencias
☐ tablas del listado de secuencias
 - b. Formato del material
☒ en forma escrita
☒ en forma legible por computadora
 - c. Momento de la presentación
☒ comprendido en la presentación internacional tal como fue presentada
☐ presentado, junto con la solicitud internacional, en forma legible por computadora
☒ suministrado posteriormente ante el organismo a los efectos de la búsqueda
3. ☒ Habiendo presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coincide con la versión original de la solicitud o que no la supera.
4. Observaciones adicionales

**INFORME ESCRITO DEL
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Referencia Internacional
PCT/EP 2004/007933

Campo Nº III **No establecimiento de un informe con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial**

La cuestión acerca de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucra actividad inventiva (no obvia) o es aplicable industrialmente no fue examinada con respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional
- ☒ reivindicaciones Nº 1 – 28, *en parte*

porque

- ☐ las mencionadas solicitud internacional o reivindicaciones Nº __ se refieren al siguiente objeto, el que no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):
- ☐ la descripción, reivindicaciones o ilustraciones (*indicar elementos particulares abajo*) o las mencionadas reivindicaciones Nº __ son tan poco claras que no se puede confeccionar un informe coherente (*especificar*):
- ☐ las reivindicaciones o las mencionadas reivindicaciones Nº __ están apoyadas tan inadecuadamente por la descripción que no se puede confeccionar un informe coherente.
- ☒ no se confeccionó ningún informe de búsqueda para toda la solicitud o para las mencionadas reivindicaciones Nº 1 – 28, *en parte*.
- ☐ el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos no cumple con el estándar provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, porque:
- | | |
|----------------------------------|--|
| la forma escrita | ☐ no fue suministrada |
| | ☐ no cumple con el estándar |
| la forma legible por computadora | ☐ no fue suministrada |
| | ☐ no cumple con el estándar |
- ☐ las tablas relacionadas con el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, el está forma legible por computadora, no cumple con los requerimientos técnicos provistos por el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ para otros detalles, ver hoja adjunta

263
240

Campo N° V	Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución		
1. Resolución			
Novedad	Si	Reivindicaciones:	10, 21
	No	Reivindicaciones:	1 – 8, 11 – 20, 22 – 28
Actividad inventiva	Si	Reivindicaciones:	
	No	Reivindicaciones:	1 – 28
Aplicabilidad industrial	Si	Reivindicaciones:	1 – 28
	No	Reivindicaciones:	
2. Documentos y aclaraciones:			
ver hoja adjunta			

Campo N° VI	Documentos definidos presentados
1. Documentos definidos presentados (reglas 43bis y 70,10)	
y/o	
2. Declaraciones no escritas	
ver formulario 210	

264
291

Con respecto al ítem III

No confección de Informe con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial

En la presente solicitud el Organismo de Búsqueda Internacional restringió la búsqueda, según los artículos PCT 5 y 6, por las siguientes objeciones:

Las realizaciones de la invención descritas desde la página 46, renglón 5 a la página 56 y en las tablas 6 – 8 de la descripción, en tanto se refieren a los rotulados miembros humanos de enlace ED-B Tc 99m, Re 188, In 111, Y88, Lu 177, no caen en el ámbito de las reivindicaciones. Esta inconsistencia entre las reivindicaciones y la descripción resultan en dudas con respecto al objeto para el cual se pretende la protección, haciendo entonces poco claras las reivindicaciones (artículo PCT 6).

La presente reivindicación 1 no es clara con respecto a su referencia en "secuencias de dominio dadas a conocer en Pinl et al. /1998) J. Biol. Chem. 273: 21769 – 21776" (artículo PCT 6).

Las presentes reivindicaciones 1 – 4, 9 – 28 no están apoyadas por la descripción. Ninguna parte de la presente solicitud revela o ejemplifica el miembro de enlace específico reivindicado que enlaza ED-B humano, en tanto el miembro de enlace es rotulado como un isótopo seleccionado entre 76Br, 77Br, 123I, 124I, 131I y 211At y comprende una molécula de anticuerpo IgG1 completa. Todos los ejemplos de la presente solicitud se refieren a los isótopos reivindicados que comprenden únicamente una mini-inmunoglobulina, denominada SIP (páginas 27 – 38), en tanto que para la molécula completa rotulada IgG1 tabulada a modo de ejemplo, el único isótopo revelado es 125I (páginas 39 – 46), cayendo, en consecuencia, fuera del ámbito de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 9 – 28. En consecuencia, la presente solicitud carece de una revelación efectiva para un miembro de enlace específico que comprende simultáneamente ambas realizaciones técnicas, tal como está reivindicado en las presentes reivindicaciones 1 – 4, 9 – 28. En consecuencia, la presente solicitud carece de revelación (artículo PCT 5).

Las presentes reivindicaciones 1 – 7, 9 se refieren a una gran cantidad de posibles compuestos definidos como una "molécula IgG1 completa" (reivindicaciones 1 – 9); "un péptido de enlace" (reivindicación 7).

El apoyo mediante el significado del artículo PCT 6 y la revelación mediante el significado del artículo PCT 5 se encuentra, no obstante, solo en una muy pequeña proporción de los compuestos reivindicados. En el caso presente, las reivindicaciones carecen de apoyo y la solicitud carece de revelación.

Además, las presentes reivindicaciones 11 – 13 se refieren a una gran cantidad de posibles métodos definidos como "rotular un miembro de enlace específico con un isótopo seleccionado entre ..." (reivindicación 11); "oxidar un halogenuro" (claim 12); "conjugar un vehículo halogenado bifuncional activado" (reivindicación 13).

Las reivindicaciones cubren todos los métodos que poseen tales características o propiedades, en tanto que la solicitud provee apoyo mediante el significado del artículo PCT 6 y la revelación mediante el significado del artículo PCT 5 para solo una muy pequeña cantidad de tales métodos. En el caso presente, las reivindicaciones carecen de apoyo y la solicitud carece de revelación.

El apoyo se encuentra en la presente solicitud solo para aquellas partes que se refieren a los compuestos preparados en los ejemplos y aquellos específicamente definidos por sus secuencias biológicas en las reivindicaciones 1, 2, 8 y para los métodos de producción de tales radiorotulados miembros de enlace específicos y su uso, como está dado a conocer en los ejemplos.

Independientemente del razonamiento anterior, las reivindicaciones 13 – 21 también carecen de claridad (artículo PCT 6). Se intenta definir los compuestos haciendo referencia a un resultado a lograr, a saber: "expresar el ácido nucleico que codifica el miembro de enlace específico" (reivindicación 14); "cultivar células receptoras bajo condiciones aptas para la producción de un miembro de enlace específico" (reivindicación 15); "aislar y purificar el miembro de enlace específico" (reivindicación 16); "formular el miembro de enlace específico en una composición que incluye a lo menos un componente adicional" (reivindicación 17); "enlazar el miembro de enlace específico a ED-B o un fragmento de ED-B" (reivindicaciones 18, 19); "determinar la cantidad de enlaces del miembro de enlace específico" (reivindicación 21).

El ISA no confecciona ningún informe acerca de un objeto que no está cubierto por el informe de búsqueda (regla PCT 66.1(e)).

Con respecto al ítem V

Resolución fundada con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial, menciones y declaraciones que apoyan dicha resolución

Se hace notar al solicitante el hecho de que lo que el presente informe expresa como novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial se refiere solo al objeto para el cual se realizó una búsqueda internacional.

No se confecciona ningún informe acerca del objeto que no está cubierto por el informe de búsqueda (regla PCT 66.1(e)).

1. Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: BORSIL ET AL.: INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US VOL. 102, n° 1, 1 de noviembre de 2002, páginas 75 – 85
- D2: DEMARTIS S. ET AL.: EUR. J. NUCL. MED., vol. 28 N° 4, abril 2001, páginas 534 – 539
- D3: SANTIMARIA ET AL.: CLIN. CANCER RES., vol. 9 febrero 2003, páginas 571 – 579
- D4: WO 03/055917 A (BERNDORFF DIETMAR) 10 de julio de 2003
- D5: WO 01/62800 A (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE), 30 de agosto de 2001
- D6: WO 01/66599 A (PHILOGEN S.P.A. (IT)), 20 de diciembre de 2001
- D7: LI ERQIU ET AL.: PROTEIN ENGINEERING, vol 10, N° 6, 1997, páginas 731 – 736
- D8: ORLOVA ANNA ET AL.: CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol 17, N° 4, páginas 385 – 396
- D9: ZALUTSKY M R ET AL.: CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol. 6, septiembre 2000, páginas 1433 – 1455

Novedad (artículo PCT 33(2))

La presente solicitud no cumple con los criterios del artículo PCT 33(2), porque el objeto de las reivindicaciones 1 – 9, 11 – 20, 22 – 28 no es nuevo en el sentido del artículo PCT 33(2).

D1 da a conocer diferentes formatos (scFv, mini-Inmuglobulina e IgG1) del anticuerpo L19 del dominio ED-B de fibronectina (ver figura 1). Se describe un método para la producción de una estructura de mini-Inmuglobulina (rotulada SIP) que utiliza *primer* BC-618 y BC-619 (idénticos para el ejemplo de la página 35 de la presente solicitud, secuencia ID 8 y secuencia ID 9) con un ligante GGSG y un método para la producción del IgG1 completo utilizando *primer* BC-696 y BC-697 (idénticos para el ejemplo de la página 35 de la presente solicitud, secuencia ID 12 y secuencia ID 13), así como su radiolodación con 125I (idénticos para el ejemplo de la página 39 de la presente solicitud) (ver página 76; página 77, columna 2).

Se discuten el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral con los anticuerpos radorotulados y usos diagnósticos (ver página 84). También se revela la aplicación particular de isótopos de vida media corta (abarcando isótopos como los reclamados en la reivindicación 1) en inmunoscintilografía para diagnóstico *in vivo* (ver página 83, columna 2, párrafo 1). En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 1 – 9, 11 – 19, 22 – 28 no es novedoso con respecto a D1.

D2, documento mencionado por el solicitante, da a conocer (ver discusión) el bombardeo selectivo de vasculatura tumoral por un fragmento de anticuerpo humano radiohalogenado scFv específico para el dominio ED-B de fibronectina (scFv abarcados bajo el miembro de enlace específico de la presente solicitud, como en las páginas 33, 42 de la descripción; figuras 1B, 3A, 3D, 5A, 5B). También se describen métodos para la producción de anticuerpos en bacterias, purificación y radiohalogenación con ²¹¹At vía oxidación de un radiohalogenuro y conjugación del vehículo halogenado bifuncional (ver página 535, figura 1). En consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 11 – 17, 22 – 24, 26, 27 no es novedoso desde el punto de vista de D2.

D3 da a conocer la detección inmunoscintigráfica del dominio ED-B de la fibronectina, un marcador de angiogénesis, en pacientes con cáncer con ¹²³I L19 (scFv)2 (abarcado bajo miembros de enlace específicos que comprenden scFv como en la figura 1B de la descripción de la presente solicitud).

Se describen métodos para la producción de anticuerpos en bacterias, purificación y radiohalogenación con ¹²³I vía cloramina Ty conjugación del vehículo halogenado bifuncional (ver página 572). Se discuten aplicaciones diagnósticas y terapéuticas basadas sobre el uso de L19(scFv)2 radiorotulados (ver discusión).

En consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 11 – 19, 22 – 28 no es novedoso con respecto a D3.

D5 revela el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral con anticuerpos scFv radiorotulados (L19) en el dominio ED-B de la fibronectina con secuencias VH y VI como las reclamadas en la presente reivindicación 1 (ver secuencia ID 19, secuencia ID 21). Se revelan variantes funcionalmente equivalentes radioiodadas y radiorotuladas ²¹¹At L 19 (ver reivindicaciones 11 – 13, 25 – 27, ejemplos 7, figura 16). Se dan a conocer métodos de tratamiento de patologías relacionadas con angiogénesis, tales como tumores (ver reivindicaciones 32, 33; ejemplo 3, figura 15).

En consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 4, 11 – 17, 22 – 24, 26, 27 no es novedoso con respecto a D5.

D6 da a conocer la detección *in vitro* de fibronectina B en tejidos tumorales con el anticuerpo L 19 radiorotulado contra la ED-B de la fibronectina (ver ejemplo 4; reivindicación (8)). En consecuencia, el objeto de las presentes reivindicaciones 18 – 20 no es novedoso con respecto a D6.

Actividad inventiva (artículo PCT 33(3))

La presente solicitud no cumple los criterios del artículo PCT 33(1), porque el objeto de las reivindicaciones 1 – 28 no involucra una actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33(3).

El problema a resolver por la presente solicitud es la estabilidad, eliminación y actuación *in vivo* con anticuerpos en bombardeos tumorales selectivos (ver página 4, renglones 14 – 16).

La solución propuesta es la utilización de formatos de anticuerpos radiorotulados (L 19): scFv, minianticuerpos e IgG1 contra el dominio ED-B de la fibronectina en el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral en usos diagnósticos y terapéuticos, así como el método de producción de los mismos.

El documento D2 del estado de la técnica indica el bombardeo de vasculatura tumoral con la utilización del scFv del anticuerpo L 19 en el dominio ED-B de la fibronectina (ver discusión). Se describe también la radiohalogenación con ²¹¹At vía oxidación de un radiohalogenuro y la conjugación del vehículo halogenado bifuncional (ver página 535, fig. 1).

La diferencia entre D2 y el objeto de la presente solicitud es el hecho de que los otros formatos de anticuerpos L 19 mencionados en las reivindicaciones 5 – 9, así como los usos *in vitro* de los miembros de enlace específicos tales como los reclamados en las presentes reivindicaciones 20, 21, no están citados específicamente en tal documento.

267
294

No obstante, el especialista ha intentado con expectativas de éxito la utilización de un minianticuerpo estructurado como está descrito en D7 (ver introducción, figura 1) como un formato efectivo de anticuerpo contra el dominio ED-B de la fibronectina, representando un miembro de enlace específico para el bombardeo selectivo de la vasculatura tumoral en usos terapéuticos y diagnósticos. Se ha visto reforzado en esta opción por la enseñanza del mismo documento D8, que indica que "se prefiere el fragmento de anticuerpo (SIP) en lugar de anticuerpos intactos en el tratamiento de tumores sólidos, por su mejor penetración en los tejidos. También la rápida eliminación *in vivo* es ideal para el diagnóstico por imagen". y " los genes de anticuerpos pueden ser manipulados para construir una variedad de nuevas moléculas" (ver página 731, columna 1).

Se toma además en consideración que las secuencias del miembro de enlace específico contra el dominio ED-B de la fibronectina son bien conocidas en el estado de la técnica, es decir, en los documentos D1, D2 y D5 previamente discutidos (en la tabla 1 de D4 están representadas las identidades secuenciales HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de los anticuerpos en lugar de las presentes secuencias ID 1-3 y las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en lugar de las secuencias ID 4-6 respectivamente).

También se hace notar al solicitante el hecho de que todas las realizaciones cubiertas por las reivindicaciones pueden satisfacer los criterios de la actividad inventiva. Cuando la actividad inventiva está basada solo sobre el logro de un efecto técnico, tal como, en el presente caso, "para su uso en un método de tratamiento" (reivindicaciones 22, 24, 26, 27); "para su uso en un método de diagnóstico" (reivindicaciones 25, 28); todas las realizaciones exhiben esencialmente este efecto. Es concebible que todas las opciones reivindicadas son una solución al problema.

No obstante, es evidente que la cantidad de miembros de enlace específicos en los cuales "el miembro de enlace está rotulado con un isótopo seleccionado de ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I y ²¹¹At" es tal que es poco probable que todos ellos posean el efecto reivindicado. Además, tomando en consideración la enseñanza de D8, que establece que la potente radiación alfa hace inadecuada a ²¹¹At para planear dosificaciones en terapias de bombardeo de radionúclidos (ver resumen) o D9, que establece que la contribución de células muertas de ²¹¹At no enlazadas puede variar considerablemente cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos rotulados como ²¹¹At (página 1449, columna 1, párrafo 3). Por ello, como parte del objeto de las reivindicaciones 22 – 28 no exhibe este efecto técnico particular, tal objeto no puede involucrar actividad inventiva.

En consecuencia, no se puede reconocer una actividad inventiva para el objeto de las presentes reivindicaciones 1 – 28.

Con respecto al ítem VI
Documentos definidos mencionados

Documentos definidos publicados

Solicitud Nº Patente Nº	Fecha de publicación (publicación)	Fecha de presentación (presentación)	Fecha de prioridad (referencia(s) válida(s)) (prioridad)
WO 03/076469	18/09/2003	11/03/2003	11/03/2003

La solicitud PCT WO 03/076469 muestra: bombardeo selectivo de vasculaturas tumorales con diferentes formatos radiorotulados (se prefieren los isótopos Tc, Re, In, Y, Lu) de anticuerpos (L 19) del dominio ED-B de la fibronectina, incluyendo mini-inmunoglobulina e IgG1 completo, que comprende secuencias tales como las reclamadas por la presente reivindicación 1 (ver reivindicaciones 1 – 9) y sus conjugados radiorotulados (ver reivindicación 10), ejemplificadas particularmente con la preparación de derivados radiolodados (ver página 29, renglón 30 - . página 30, renglón 28).

Por ello, puede lesionar la novedad del objeto de las reivindicaciones 1 – 9, 19, 20, 22 – 28 de la presente solicitud.

PATENT COOPERATION TREATY

268
245
10/07/05

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

To:

MEWBURN ELLIS LLP
York House
Attn. Walton, Sean
23 Kingsway
London, Greater London
WC2B 6HP
UNITED KINGDOM

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

14/02/2005

Applicant's or agent's file reference

SMWEP6235147

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/EP2004/009733

International filing date
(day/month/year)

01/09/2004

Applicant

PHILOGEN S.P.A.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the international search report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.**Where?** Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Joëlle Gerber

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 16 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 16 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 48.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference SNWFP6235147	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2004/009733	International filing date (day/month/year) 01/09/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10/09/2003
Applicant PHILOGEN S. P. A		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒

With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

TARGETING OF TUMOR VASCULATURE USING RADIOLABELLED ANTIBODY L19 AGAINST FIBRONECTIN ED-B

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☐

none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/009733

279
299

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in computer readable form

☒

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009733

300

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K51/10 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BORSI L ET AL: "Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 102, no. 1, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 75-85, XP002252051 ISSN: 0020-7136 page 76; figures 1,4 page 84 page 77, column 2, paragraph 2 see discussion ----- -/-	1-9, 11-19, 22-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 2005

Date of mailing of the international search report

14/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Gonzalez Ramon, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009733274
301

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEMARTIS S. ET AL: "Selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin" EUR. J. NUCL. MED., vol. 28, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 534-539, XP001184113 cited in the application abstract page 535 - page 536; figure 1 see discussion	1-4, 11-17, 22-24, 26,27
X	SANTIMARIA M. ET AL: "Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer" CLIN. CANCER RES., vol. 9, February 2003 (2003-02), pages 571-579, XP001184112 abstract page 572, column 1, paragraph 3 - page 572, column 2, paragraph 2 see discussion	1-9, 11-19, 22-28
X	WO 03/055917 A (BERNDORFF DIETMAR ;DINKELBORG LUDGER (DE); HILGER CHRISTOPH-STEPAN) 10 July 2003 (2003-07-10) page 8; claims 5,6,14,15; table 1 page 16; example 15	1-4,9, 11-28
P,X	WO 03/076469 A (SCHERING AG ;FRIEBE MATTHIAS (DE); HILGER CHRISTOPH-STEPHAN (DE);) 18 September 2003 (2003-09-18) page 29 - page 30; claims 1-10,15-26; figure 1	1-9, 11-28
X	WO 01/62800 A (EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE) 30 August 2001 (2001-08-30) see seq ID 19, seq ID 21claims 11-13,25-27,32,33; figures 6,15,16; examples 3,7	1-4, 11-17, 22-24, 26,27
X	WO 01/96599 A (CASTELLANI PATRIZIA ;ZARDI LUCIANO (IT); PHILOGEN S R L (IT); ZIJL) 20 December 2001 (2001-12-20) pages 32-34; claim 8	18-20
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009733225
302

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	MARTY C ET AL: "Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in <i>Pichia pastoris</i> " PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, US, vol. 21, no. 1, February 2001 (2001-02), pages 156-164, XP002242574 ISSN: 1046-5928	1-28
X	page 156, column 2: figure 1 page 159, column 2, paragraph 3 - page 160, column 1, paragraph 1	18-20
Y	LI ERQIU ET AL: "Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP)" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 6, 1997, pages 731-736, XP002252049 ISSN: 0269-2139 see discussion abstract; figure 1	1-28
Y	ORLOVA ANNA ET AL: "Comparative biodistribution of the radiohalogenated (Br, I and At) antibody A33. Implications for in vivo dosimetry" CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 17, no. 4, 2002, pages 385-396, XP008027054 ISSN: 1084-9785 abstract	22-28
Y	ZALUTSKY M R ET AL: "ASTATINE-211-LABELED RADIOTHERAPEUTICS: AN EMERGING APPROACH TO TARGETED ALPHA-PARTICLE RADIOTHERAPY" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, SCHIPHOL, NL, vol. 6, September 2000 (2000-09), pages 1433-1455, XP000949215 ISSN: 1381-6128 page 1437, column 2 page 1448, column 2 - page 1449, column 1 ----- -/--	22-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009733276
303

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PINI A ET AL: "Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 34, 21 August 1998 (1998-08-21), pages 21769-21776, XP002124781 ISSN: 0021-9258 cited in the application abstract; table 2	1-28
T	MATTER, C. M. ET AL: "Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin" CIRCULATION RESEARCH, vol. 95, 2004, pages 1225-1233, XP008042282 see discussion page 1226, column 1, paragraph 4	1-9, 11-19, 22-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/009733

277
304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03055917 A	10-07-2003	AU 2003210149 A1	15-07-2003
		BR 0306715 A	28-12-2004
		CA 2468081 A1	10-07-2003
		WO 03055917 A2	10-07-2003
		EP 1461360 A2	29-09-2004
		US 2004001790 A1	01-01-2004
WO 03076469 A	18-09-2003	CA 2478414 A1	18-09-2003
		EP 1483297 A2	08-12-2004
		WO 03076469 A2	18-09-2003
WO 0162800 A	30-08-2001	AU 4243201 A	03-09-2001
		CA 2400622 A1	30-08-2001
		WO 0162800 A1	30-08-2001
		EP 1259548 A1	27-11-2002
		JP 2003524018 T	12-08-2003
		US 2003176663 A1	18-09-2003
WO 0196599 A	20-12-2001	AU 8182401 A	24-12-2001
		WO 0196599 A2	20-12-2001

OLARTERAISBECK

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Rad: 06-034844-00001-0000 Fee: 2006-04-11 08:52:28
 Dep. 2020 NUECREACIONES
 Tra: 11 PATENTEYII Evs 379 FASENACIONAL
 Act 328 CTOINFORMACION Folios: 277

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
 PCT
 ENTRADA EN FASE NACIONAL

10.05-2006

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.SOLICITANTE
(71)

Nombre: SCHERING AKTIENGESellschaft
y PHILOGEN S.P.A.
 Dirección: Müllerstrasse 178, 13342, Berlin
Alemania, y La Lizza 7, 53100 Siena, Italia
 Nacionalidad o Domicilio: ALEMANA e ITALIANA
 Lugar de Constitución: ALEMANIA e ITALIA

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Teléfono: _____ Fax: _____
 E-mail: _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: J. IAN RAISBECK
 Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10
 Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
 E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 79.376.996 Btá
TP 135.799INVENTOR (ES)
(72)Nombre: VER PAGINA ADJUNTADirección: VER PAGINA ADJUNTANacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/009733 Fecha Septiembre 1, 2004Publicación Internacional No. WO 2005/023318 Fecha Marzo 17, 2005

Título (54) RECONOCIMIENTO DIRIGIDO DE LA VASCULATURA TUMORAL
USANDO EL ANTICUERPO L19 CONTRA ED-B DE FIBRONECTINA MARCADO
RADIOACTIVAMENTE.

Clasificación Internacional (51) A61K 51/10, A61P 35/00, A61U 51/02.A61U 39/395, 39/41,

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

US

(32) Fecha

Septiembre 10, 2003

Septiembre 10, 2003

(31) Número de Solicitud

03255633.4

60/501.881

Comprobante de pago No. 06-26.005Fecha Abril 4, 2006

REIVINDICACIONES:

1. Un elemento de unión específico que se une al ED-R humano, donde dicho elemento de unión específico está marcado con un isótopo seleccionado del grupo formado por ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I y ^{211}At y comprende un sitio de unión al antígeno que comprende un dominio de anticuerpo VH y un dominio de anticuerpo VL, donde dicho dominio de anticuerpo VH se selecciona del grupo formado por el dominio VH de L19 y un dominio VH que comprende una VH CDR1, una VH CDR2 y una VH CDR3, donde dicha VH CDR3 es la L19 VH CDR3 de la SEQ ID N°: 3, la VH CDR1 es opcionalmente la L19 VH CDR1 de la SEQ ID N°: 1 y la VH CDR2 es opcionalmente la L19 VH CDR2 de la SEQ ID N°: 2; y donde el dominio de anticuerpo VL se selecciona opcionalmente del grupo formado por el dominio VL de L19 y un dominio VL que comprende una VL CDR1, una VL CDR2 y una VL CDR3, donde la VL CDR3 es la L19 VL CDR3 de la SEQ ID N°: 6, la VH CDR1 es opcionalmente la L19 VL CDR1 de la SEQ ID N°: 4 y la VL CDR2 es opcionalmente la L19 VL CDR2 de la SEQ ID N°: 5; donde las secuencias del dominio VH de L19 y del dominio VL de L19 se describen en Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21769-21776; donde el elemento de unión específico comprende una mini-inmunoglobulina que comprende dicho dominio de anticuerpo VH y el dominio de anticuerpo VL, fusionados a $\text{ss}_2\text{-CH4}$ y dimerizados o bien, comprende una molécula completa del anticuerpo IgG1.

Lista de Inventores PCT

BORSI Laura

Laboratory of Cell Biology

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro

Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia

de nacionalidad italiana

CARNEMOLLA Barbara

Laboratory of Cell Biology

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro

Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia

de nacionalidad italiana

BALZA Enrica

Laboratory of Cell Biology

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro

Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia

de nacionalidad italiana

CASTELLANI Patrizia

Laboratory of Cell Biology

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro

Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia

de nacionalidad italiana

ZARDI Luciano

Laboratory of Cell Biology

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro

Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 Genova, Italia

de nacionalidad italiana

FRIEBE Matthias

Ruschstrasse 8

13509 Berlin, Alemania

de nacionalidad alemana

HILGER Christoph-Stephan

Langenauer Weg 24

13503 Berlin, Alemania

de nacionalidad alemana

278
308

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

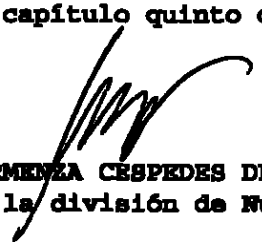
REFERENCIA	Radicación No.	06 34944
	Solicitud internacional	EP2004/009733
	Fecha inicio fase nacional	10/05/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	8432

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CRESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04-AGO-2006 jramos