

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 140**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/10** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11700972 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2528627**

54 Título: **Nuevos radioinmunoconjugados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**29.01.2010 US 299524 P**

**29.01.2010 NO 20100143**

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

**17.06.2014**

73 Titular/es:

**NORDIC NANOVECTOR AS (100.0%)**

**Kjelsåsveien 163 B**

**0884 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**LARSEN, ROY, H.;**

**DAHLE, JOSTEIN y**

**BRULAND, ØYVIND, S.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 469 140 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Nuevos radioinmunoconjugados y usos de los mismos

**5 Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a la radioinmunoterapia de cáncer hematológico con un anticuerpo monoclonal radiomarcado con una citotoxicidad inesperadamente alta.

**10 Antecedentes de la invención**

La terapia con anticuerpos radiomarcados ha sido introducida contra el linfoma no Hodgkin (NHL – siglas en inglés) y es un método aprobado hoy en día. Dos productos están en el mercado, Zevalin™ y Bexxar™, y ambos fijan como objetivo el antígeno CD20 (Jacene et al., 2007).

15 También el agente inmunoterapéutico rituximab (Rituxan™/Mabthera™) fija como objetivo el antígeno CD20. Un problema con el tratamiento contra la misma diana es la posibilidad de la deriva inmunofenotípica durante el curso de la enfermedad (Ngo et al., 2009), que podría causar efectos disminuidos de la terapia de CD20 cuando se repite en el tiempo como en la terapia con rituximab, o si se administra radioinmunoterapia (RIT) basada en CD20 después de una terapia prolongada con rituximab.

20 Un gran número de pacientes que reciben terapia dirigida contra CD20 experimentará finalmente una recidiva (Buchegger et al, 2006;. Gordon et al 2004). Por lo tanto, hay una necesidad significativa de una RIT que fije como objetivo otro antígeno que no sea CD20 en pacientes con NHL.

25 En el desarrollo temprano de RIT, se evaluaron como dianas los dos antígenos CD37 y CD20 (Press et al., 2001). Se concluyó que la RIT que fija como objetivo CD20 era más apropiada y, por lo tanto, se abandonó el desarrollo la RIT dirigida a CD37. Por lo tanto, se conoce en la técnica que los anticuerpos monoclonales son adecuados para su uso en la RIT contra el linfoma, pero que el radioinmunoconjugado (RIC) que fija como objetivo CD20 es superior a RIC que fija como objetivo CD37 (Press et al., 2001).

30 En los últimos años ha atraído un cierto nuevo interés CD37 (Heider et al, 2009;. Grosmaire, 2007), principalmente como diana para la inmunoterapia utilizando construcciones de anticuerpos quiméricos o humanizados. Estos trabajos desaconsejan utilizar anticuerpos monoclonales de IgG murinos convencionales, ya que los anticuerpos murinos pueden inducir la producción de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) en pacientes, lo que puede causar incomodidad y una eficacia reducida de inmunoterapias.

35 Para la RIT, se siguen considerando interesantes anticuerpos monoclonales murinos convencionales, ya que, en general, las dosis de proteínas utilizadas son más bajas y el tratamiento no necesita ser repetido en la misma medida que con la inmunoterapia. También el aclaramiento de IgG murina es en general ligeramente más rápido que las versiones humanizadas o quiméricas de la misma IgG, que pueden ser más apropiadas en términos de exposición a la radiación de todo el cuerpo de RIT, por lo menos en algunas configuraciones. Cabe señalar que tanto Bexxar como Zevalin se basan en anticuerpos murinos.

40 La presente invención proporciona el anticuerpo anti-CD37 murino HH1 como soporte para radioisótopos. El clon de hibridoma original que produce el anticuerpo anti-CD37 murino HH1 fue desarrollado en la década de 1980 (Smeland et al., 1985) y el anticuerpo HH1 ha estado en venta para uso in vitro en la inmunohistoquímica durante varios años.

45 Este documento también describe HH1 marcado con <sup>125</sup>I, que se utilizó en estudios in vitro con el fin de visualizar por autorradiografía antígenos HH1.

Smeland et al. no describen HH1 marcado con un radionucleido tal como se describe en la presente invención.

50 HH1 no ha sido previamente evaluado para la radioinmunoterapia en términos de biodistribución y citotoxicidad celular. Por lo tanto, el presente trabajo se realizó para evaluar la idoneidad de HH1 en radioinmunoterapia. En contraposición con el anterior trabajo clínico y preclínico con RIC anti-CD37, que utiliza <sup>131</sup>I radiomarcado directamente a los residuos de tirosina utilizando los métodos cloraminaT / yodógeno, el HH1 fue radiomarcado a través de un quelante utilizando un radionucleido metálico en lugar de un halógeno.

60

El uso de un radionucleido metálico marcado a través de un quelante-enlazador podría ser ventajoso, ya que el uso de anticuerpos marcados con  $^{131}\text{I}$  se asocia con la exposición del tiroides a diversas cantidades de yodo liberado de los RICs.

5 En un estudio previo para evaluar si HH1 era adecuado para producir un radioinmunoconjugado, CHX-A-DTPA se conjugó a HH1 y el conjugado se marcó con  $^{205,206}\text{Bi}$  para fines de modelado in vitro (Henriksen et al., 1997).

La captación en la línea celular Raji se comparó para bismuto conjugado a HH1 o estreptavidina. En este último caso, las células habían sido pre-saturadas con HH1 biotinilado.

10 En este procedimiento de dos etapas biotina-estreptavidina las células tumorales se pre-fijaron como objetivo con el anticuerpo biotinilado, seguido de la administración de estreptavidina marcada radiactivamente.

Henriksen et al. no describe un radioinmunoconjugado de acuerdo con la presente invención.

15 Se encontró que el número requerido de quelantes para garantizar un RIC funcional cuando se marcan con  $^{212}\text{Bi}$  o  $^{213}\text{Bi}$  fue un factor limitante. Por consiguiente, se sugirió el uso de HH1 biotinilado en lugar de una RIC basada en HH1. Una vez unido a las células, el HH1 biotinilado podría ser fijado como objetivo a continuación con estreptavidina marcada radiactivamente.

20 Por lo tanto, el trabajo sugiere que HH1 marcado con un radionucleido que emite partículas alfa era menos útil debido a la actividad específica insuficiente en las concentraciones de quelante consideradas tolerable para que el HH1 conserve una capacidad de unión suficiente.

25 También se indicó en el documento que un emisor beta sería incluso menos adecuado para la construcción de un RIC funcional en comparación con un emisor alfa (Henriksen et al, 1997), dado que los autores establecieron que la radioterapia dirigida con emisor beta debe ser inferior en enfermedades diseminadas, porque el fuego cruzado es esencial para obtener un efecto suficiente.

30 Por lo tanto, el trabajo citado anteriormente desaconseja utilizar un HH1 directamente quelado en radioinmunoterapia y también desaconseja utilizar HH1 en un RIC basado en emisores beta.

35 Press et al. (New England J. Med., vol. 329, n° 17, 1993, páginas 1219-1224) y Kaminski et al. (J. Clin. Oncol., vol. 10, n° 11, 1992, 1996-1711) describen radioinmunoconjugados que comprenden el anticuerpo monoclonal (mAb – siglas en inglés) anti-CD37 murino MB-1 marcado con yodo 131 para su uso en el tratamiento del linfoma de células B.

40 Estos dos documentos no describen un radioinmunoconjugado de acuerdo con la presente invención en el que el anticuerpo anti-CD37 es el mAb HH1 murino,

45 El documento WO 2009/019312 describe anticuerpos anti-CD37 que pueden ser marcados radiactivamente para formar radioinmunoconjugados.  $^{32}\text{P}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{188}\text{Re}$  se citan como radionucleidos adecuados con propiedades de radiación ventajosas. Este documento describe que las moléculas de anticuerpo anti-CD37 se pueden marcar con diversos radionucleidos utilizando métodos de marcaje directo o de marcaje indirecto.

Este documento no describe un radioinmunoconjugado en el que el anticuerpo anti-CD37 sea el mAb murino HH1.

### Sumario de la invención

50 La presente invención se refiere a un radioinmunoconjugado que une CD37 humano que comprende anticuerpo monoclonal murino HH1, un enlazador quelante y un radionucleido seleccionado del grupo que consiste en  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{177}\text{Lu}$ .

55 En una realización de la presente invención, el enlazador es un enlazador quelante y el radionucleido es  $^{177}\text{Lu}$ .

Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un radioinmunoconjugado de la presente invención, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

60 En una forma de realización de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención comprende uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados adicionales.

En otra forma de realización de la presente invención, los uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados adicionales fijan como objetivo CD20.

5 Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la presente invención para uso en el tratamiento de células B malignas que expresan el antígeno CD37.

En una forma de realización de la presente invención, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica.

10 Un aspecto de la presente invención se refiere al uso del radioinmunoconjugado de la presente invención para uso en el tratamiento de malignidades de células B.

15 Una forma de realización de la presente invención se refiere al radioinmunoconjugado de la presente invención para su uso en el tratamiento de malignidades de células B, en donde el radioinmunoconjugado se administra en combinación con o además de otra terapia.

En una forma de realización de la presente invención, la terapia se selecciona de pre-tratamiento, quimioterapia, terapia de anticuerpos monoclonales, cirugía, radioterapia y/o terapia fotodinámica.

20 En otra forma de realización de la presente invención, la terapia comprende un pre-tratamiento utilizando anticuerpo monoclonal anti-CD20 y/o anti-CD37 antes del tratamiento con el radioinmunoconjugado de la presente invención.

25 Un aspecto de la presente descripción se refiere a la composición farmacéutica de la presente invención para uso en un método para el tratamiento de una neoplasia maligna de células B seleccionada de linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica, que comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la producción del radioinmunoconjugado de la presente invención que comprende dos o más viales, en donde un vial contiene un conjugado que comprende un quelante ligado a un anticuerpo monoclonal murino HH1; y un segundo vial que contiene un radionucleido, seleccionado del grupo que consiste en  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$  y  $^{90}\text{Y}$ .

35 Una forma de realización de la presente invención se refiere a un kit de la presente invención, en el que el contenido de uno o varios de los viales está liofilizado o en una disolución.

En otra forma de realización de la presente invención, el radioinmunoconjugado se genera mezclando el contenido de los dos viales.

40 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1

Anticuerpo unido a la célula inmediatamente (A) y 96 horas (B) después del lavado para la incubación de células Raji, Rael y Daudi con  $^{111}\text{In}$ -HH1,  $^{111}\text{In}$ -rituximab,  $^{125}\text{I}$ -HH1 y  $^{125}\text{I}$ -rituximab.

45 **Figura 2**  
Actividad unido células Daudi después de incubación con  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 o  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab durante 2 h (A) y 18 h (B). Células bloqueadas se bloquearon con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

50 **Figura 3**  
Crecimiento de células Daudi incubadas con  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 (A) o  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab (B) durante 2 h antes del lavado.

Figura 4

Crecimiento de células Daudi incubadas con  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 (A) o  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab (B) durante 18 h antes del lavado.

55 **Figura 5**  
Biodistribución de  $^{111}\text{In}$ -marcado a través de quelante a HH1 en ratones con xenoinjertos Daudi

Figura 6

60 **Histogramas FITC** de células Daudi no marcadas, células Daudi marcadas con anticuerpo secundario solamente, o marcadas con HH1, ON.108, IPO.24 o 6D263.

Figura 7

Biodistribución de  $^{177}\text{Lu}$ -en ratones inmunológicamente deficientes hembras con tumor Daudi.

5 Figura 8

Terapia de ratones con células Daudi inyectadas iv. La supervivencia de los ratones tratados con 50 y 100 MBq/kg de  $^{177}\text{Lu}$ -HH1, HH1 frío, rituximab frío y NaCl.

**Descripción detallada de la invención**

10

La presente descripción se refiere al uso de anticuerpos HH1 en radioinmunoterapia.

15

La combinación de un radionucleido de metal, enlazador quelante y anticuerpo monoclonal anti-CD37 ha demostrado, sorprendentemente, que HH1 radiomarcado tiene una biodistribución y la captación tumoral relevantes en un modelo de ratón con xenoinjerto/inmunológicamente deficiente.

Esta es una información importante que indica la idoneidad para su uso en la radioinmunoterapia.

20

Radioinmunoconjugados

La presente invención muestra, sorprendentemente, que el radioinmunoconjugado  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 exhibía una citotoxicidad significativa en células tumorales diseminadas y que  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 era más citotóxico que  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab contra las células tumorales para una dosis dada.

25

Este hallazgo era inesperado, ya que más radiactividad estaba ligada por célula y la retención del radionucleido ligado era similar o mejor para  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab. Esta enseña, en contra del conocimiento común en el sector, que es que el anticuerpo anti-CD20 es mejor que el anticuerpo anti-CD37 para la radioinmunoterapia. Además de ello, el presente trabajo difiere de la noción anterior de que para un emisor beta, el fuego cruzado, que no se pueda obtener en células diseminadas, sería esencial para la obtención de un efecto suficiente (Henriksen et al., 1997).

30

La razón del efecto observado no está clara. Los datos de los experimentos con diferentes dosis de HH1 no marcado y rituximab no indicaban efecto alguno de los anticuerpos no marcados en el ensayo de cultivo utilizado.

35

Una posible explicación podría ser que hay menos células con muy baja densidad de antígenos entre CD37 frente a CD20, a pesar de que CD20 es, por término medio, más fuertemente expresado en la línea celular utilizada.

40

Los datos de retención no sugirieron una mejor retención debido a la internalización de CD37, que de otro modo sería una posible explicación, ya que se ha reseñado una cierta internalización con el antígeno CD37 (Press et al, 2001).

40

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un radioinmunoconjugado que se une a CD37 humano que comprende anticuerpo monoclonal murino HH1, un enlazador quelante y un radionucleido seleccionado del grupo que consiste en  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{177}\text{Lu}$ .

45

En otra realización de la presente invención, el radionucleido es  $^{177}\text{Lu}$ .

En aún otra realización, el radionucleido es otro emisor beta o un emisor alfa de acuerdo con las reivindicaciones.

50

La presente invención sugiere, con los datos in vitro, que HH1 radiomarcado se une de manera más eficaz al antígeno CD37 que lo que lo hace el rituximab radiomarcado al antígeno CD20, es decir, alcanzó el máximo de unión al antígeno, requiriéndose menos anticuerpos circulantes (Tabla 2, Figura 2).

55

También requería menos tiempo para alcanzar una unión máxima (Figura 2). Estas serían también las características importantes in vivo, ya que esto significa que las células tumorales pueden atrapar el RIC, incluso a una baja concentración de anticuerpos circulantes, una situación que puede ocurrir en zonas menos disponibles de tumores sólidos y para células tumorales individuales y micrometástasis ubicadas en zonas remotas de los tejidos normales.

60

Esto es significativamente diferente de los datos previos que indicaban que se requería una concentración de anticuerpos más alta con otro anticuerpo anti-CD37 que HH1 (Bernstein et al., 1990), también en comparación con un anticuerpo anti-CD20 (Press et al., 1993), para saturar antígeno y obtener una biodistribución favorable.

Además, la presente invención muestra que HH1 tiene algunas propiedades de unión a antígeno diferentes en comparación con un panel de tres anticuerpos anti-CD37 diferentes - a pesar de que todos los anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo.

5 Experimentos de bloqueo, es decir, utilizando células pre-saturadas con anticuerpo no marcado, demostraron que HH1 bloquearía que el CD37 en células vivas se uniera a HH1 radiomarcado, sustancialmente mejor que los otros tres anticuerpos anti-CD37.

10 En un ensayo de células comparando anticuerpos radiomarcados, HH1 mostró una fracción inmunorreactiva mucho mejor en comparación con los otros tres anticuerpos. Por fracción inmunorreactiva se quiere dar a entender la fracción de anticuerpo que puede unirse al antígeno si existe un exceso ilimitado de antígenos. Diferentes anticuerpos pueden tener una capacidad diferente de preservar la inmunorreactividad después de pasar por un proceso de marcaje. Los resultados en el Ejemplo 6, Experimento IV, Tabla 5 demuestran que la inmunorreactividad de HH1 se conservaba mejor que la inmunorreactividad de tres anticuerpos comercialmente  
15 disponibles.

Por otro lado, los análisis de inmunohistoquímica demostraron que los tres anticuerpos tiñeron secciones de tejido de muestras de tumores fijadas embebidas en parafina, mientras que HH1 fracasó en hacerlo. Las diferencias en las interacciones antígeno-anticuerpo no fueron detectables por citometría de flujo.  
20

Los histogramas de citometría de flujo eran similares para HH1 y los otros tres anticuerpos anti-CD37 (Figura 6). En conjunto, estos datos demuestran que HH1 tiene una interacción con el antígeno individual significativa, que en varios aspectos no se puede predecir a partir de estudios con otros anticuerpos anti-CD37.

25 El nuevo radioinmunoconjugado anti-CD37 con fuertes propiedades citotóxicas descritas aquí consiste en el anticuerpo monoclonal murino HH1, un enlazador quelante, y el emisor beta <sup>177</sup>Lu.

30 El radionucleido puede unirse al anticuerpo haciendo reaccionar primero un quelante bifuncional, p. ej. p-SCN-bn-DOTA (Macrocyclics, Tx, EE.UU.) con el anticuerpo, seguido de purificación para separar el quelante no conjugado, y luego reacción del quelante conjugado de anticuerpo con el radionucleido, seguido de purificación para separar cualquier radionucleido no conjugado.

Alternativamente, el quelante y el radionucleido se pueden combinar en primer lugar y posteriormente conjugar con el anticuerpo.  
35

Se pueden utilizar enlazadores quelantes tales como, p. ej., p-SCN-bn-DOTA, para conjugar otros radionucleidos de metales a HH1 de una manera similar a la descrita para <sup>177</sup>Lu.

40 Se podría utilizar cualquier tipo de enlazador con una capacidad complejante suficiente y un grupo funcional que permita la conjugación directa o indirecta a una proteína o un péptido. Ejemplos de tales enlazadores se describen en la bibliografía (p. ej., Brechbiel, 2008; Liu, 2008). Algunos ejemplos útiles son quelantes bifuncionales cíclicos tales como p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-éster; quelantes lineales bifuncionales tales como p-SCN-Bn-DTPA y CHX-A"-DTPA.

45 Los radionucleidos en la presente invención se conjugarán preferiblemente a una molécula fijadora de objetivo mediante el uso de quelantes bifuncionales.

Estos podrían ser quelantes cíclicos, lineales o ramificados. Se puede hacer referencia particular a los quelantes de poliaminopoliácidos que comprenden una cadena principal de poli-aza-alcano lineal, cíclica o ramificada con grupos de carácter ácido (p. ej., carboxialquilo) fijados en los nitrógenos de la cadena principal.  
50

Ejemplos de quelantes adecuados incluyen derivados DOTA tales como ácido p-isotiocianatobencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (p-SCN-Bz-DOTA) y derivados de DTPA tales como ácido p-isotiocianatobencil-dietilentriaminopentaacético (p-SCN-Bz-DTPA), siendo el primero quelantes cíclicos y el último quelantes lineales.  
55

La metalación del resto complejante se puede realizar antes o después de la conjugación del resto complejante para el resto de fijación de objetivo.

60 El proceso de radiomarcaje en general será más conveniente en términos de tiempo utilizado, etc., si el quelante se conjuga con el anticuerpo antes de que tenga lugar el radiomarcaje.

Los principios de la preparación de conjugados radiomarcados utilizando quelantes fijados a anticuerpos se describen más ampliamente, p. ej., en Liu, 2008.

Por lo tanto, HH1 se puede utilizar para preparar radioinmunoconjugados con diferencias en las propiedades de radiación y semividas eficaces.

5 Por ejemplo el radioinmunoconjugado anti-CD37 que consiste en el anticuerpo monoclonal murino HH1, un enlazador quelante y un radionucleido emisor de beta o alfa que incluye  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$  y  $^{90}\text{Y}$  se puede preparar y utilizar para la producción de preparados farmacéuticos y puede utilizarse en aplicaciones terapéuticas.

#### 10 Composiciones farmacéuticas

15 Un producto radioinmunoterapéutico basado en HH1 se proporcionaría típicamente como una composición farmacéutica que consiste en un radionucleido, de acuerdo con la descripción anterior, enlazado a través de un quelante al anticuerpo monoclonal murino HH1 disuelto en una disolución tampón, que en una medida sustancial mantiene la integridad química del radioinmunoconjugado y está siendo fisiológicamente aceptable para la infusión en pacientes.

20 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un radioinmunoconjugado de la presente invención, y un soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Soportes farmacéuticos aceptables incluyen, pero no se limitan a tampones no tóxicos, cargas, disoluciones isotónicas, etc. Más específicamente, el soporte farmacéutico puede ser, pero no se limita a disolución salina normal (al 0,9%), disolución salina semi-normal, lactato de Ringer, dextrosa al 5%, dextrosa al 3,3%/disolución salina al 0,3%. El soporte fisiológicamente aceptable puede contener un estabilizante radiolítico, p. ej. ácido ascórbico, que protege la integridad del radiofármaco durante el almacenamiento y transporte.

30 Una forma de realización de la presente invención comprende la composición farmacéutica de la presente invención, que comprende, además, uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados adicionales tales como los anticuerpos Rituximab, Epratuzumab, L19, F8, F16, Galiximab, Toralizumab, Alemtuzumab, Ofatumumab, Veltuzumab, Afutuzumab, Tositumomab, Reditux e Ibritumomab o los radioinmunoconjugados Zevalin y Bexxar.

35 En otra forma de realización de la presente invención, el uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados adicionales fijan como objetivo CD20 tales como los anticuerpos Rituximab, Veltuzumab, Ofatumumab, Afutuzumab, Tositumomab, Reditux e Ibritumomab o los radioinmunoconjugados Zevalin y Bexxar.

Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de la presente invención para uso en el tratamiento de células malignas de células B que expresan el antígeno CD37.

40 En una forma de realización de la presente invención, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica.

#### Identidad de secuencia

45 Como comúnmente se define "identidad" se define aquí como una identidad de secuencia entre los genes o proteínas a nivel de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente.

Por lo tanto, en el presente contexto "identidad de secuencia" es una medida de la identidad entre proteínas en el nivel de aminoácidos y una medida de la identidad entre ácidos nucleicos a nivel de nucleótidos.

50 La identidad de secuencia de proteínas se puede determinar comparando la secuencia de aminoácidos en una posición dada en cada una de las secuencias cuando las secuencias están alineadas.

Del mismo modo, la identidad de secuencia del ácido nucleico se puede determinar comparando la secuencia de nucleótidos en una posición dada en cada una de las secuencias cuando las secuencias están alineadas.

55 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos o de dos aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes o posiciones de nucleótidos.

60 Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El

porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad =  $n^{\circ}$  de posiciones idénticas/número total de posiciones (p. ej., posiciones solapantes) x 100). En una forma de realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

5 Se pueden alinear manualmente las secuencias y se puede contar el número de ácidos nucleicos o aminoácidos idénticos. Alternativamente, se puede lograr la alineación de dos secuencias para la determinación del porcentaje de identidad utilizando un algoritmo matemático. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención.

15 Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST. Alternativamente, se puede utilizar PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas NBLAST, XBLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alternativamente, la identidad de secuencia se puede calcular después de haber alineado las secuencias, p. ej. por el programa BLAST en la base de datos EMBL ([www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST)).

20 En general, para la alineación se puede utilizar la configuración predeterminada por defecto con respecto a, p. ej., "matriz de puntuación" y "penalización por hueco". En el contexto de la presente invención, puede ser ventajosa la configuración predeterminada por defecto de BLASTN y PSI BLAST.

25 El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, sólo se cuentan coincidencias exactas.

30 Se describe en esta memoria un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que comparte un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de VH del anticuerpo HH1 (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 3).

35 Se describe en esta memoria un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia con la secuencia de VH del anticuerpo HH1 (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 3).

40 Se describe en esta memoria un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que comparte al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia VH del anticuerpo HH1 (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 3) tal como un 90% de identidad, un 91% de identidad, un 92% de identidad, un 93% de identidad, un 94% de identidad, un 95% de identidad, un 96% de identidad, un 97% de identidad, un 98% de identidad o un 99% de identidad.

45 La presente descripción se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos que comparte un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de VH del anticuerpo HH1 (SEQ ID NO: 2) y/o la secuencia de VL (SEQ ID NO: 4).

La presente descripción se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos con la secuencia de VH del anticuerpo HH1 (SEQ ID NO: 2) y/o secuencia de VL (SEQ ID NO: 4).

50 Se describe en esta memoria también un anticuerpo que comprende una secuencia que comparte al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de VH (SEQ ID NO: 2) y/o secuencia de VL (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo HH1 tal como un 90% de identidad, un 91% de identidad, un 92% de identidad, un 93% de identidad, un 94% de identidad, un 95% de identidad, un 96% de identidad, un 97% de identidad, un 98% de identidad o un 99% de identidad.

## 55 Variación Genética

La variación genética es provocada por la variación en el orden de las bases en los nucleótidos en los genes. Esta variación determina mutaciones en los genes y, subsiguientemente, en las proteínas que codifican dichos genes.

60 Estas mutaciones pueden ser mutaciones o sustituciones tanto sentido como sentido erróneo.

La presente descripción se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos aislada de la cadena VH (SEQ ID NO: 1) y/o

de la cadena VL (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo monoclonal HH1 que comprende al menos 50, tal como 20, tal como 10, tal como 5, tal como 4, tal como 3, tal como 2, tal como 1 mutaciones sentido.

5 La presente descripción se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos aislada de la cadena VH (SEQ ID NO: 1) y/o de la cadena VL (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo monoclonal HH1 que comprende 0-50, tal como 1-50, tal como 0-20, tal como 1-20, tal como 0-10, tal como 1-10, tal como 0-5, tal como 1-5, tal como 3, tal como 1 mutaciones sentido.

10 Una mutación sentido erróneo (un tipo de mutación no sinónima) es una mutación puntual en el que se cambia un solo nucleótido, dando como resultado un codón que codifica un aminoácido diferente (mutaciones que cambian un aminoácido por un codón de terminación se consideran mutaciones sin sentido, más que las mutaciones sentido erróneo). Una mutación sentido erróneo puede hacer que la proteína resultante sea no funcional.

15 Sin embargo, no todas las mutaciones sentido erróneo conducen a cambios apreciables en las proteínas. Un aminoácido puede ser reemplazado por un aminoácido de propiedades químicas muy similares, en cuyo caso la proteína puede todavía funcionar normalmente; esto se denomina una mutación neutra, "tranquila" o conservadora.

20 Alternativamente, la sustitución de aminoácidos podría ocurrir en una región de la proteína que no afecta de manera significativa la estructura secundaria o función de la proteína. Cuando un aminoácido puede ser codificado por más de un codón (la denominada "codificación degenerada") una mutación en un codón puede no producir cambio alguno en la traducción; esto sería una mutación sinónima (una forma de mutación silenciosa) y no una mutación sin sentido.

25 La presente descripción se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos de la cadena VH (SEQ ID NO: 1) y/o la cadena VL (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo monoclonal HH1 que comprende al menos 50, tal como 20, tal como 10, tal como 5, tal como 4, tal como 3, tal como 2, tal como 1 mutaciones sentido erróneo.

30 La presente descripción se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptidos de la cadena VH (SEQ ID NO: 1) y/o la cadena VL (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo monoclonal HH1 que comprende 0-50, tal como 1-50, tal como 0-20, tal como 1-20, tal como 0-10, tal como 1-10, tal como 0-5, tal como 1-5, tal como 3, tal como 1 mutaciones sentido erróneo.

35 Una sustitución conservadora es una sustitución de un aminoácido con otro con propiedades similares en general de tal manera que es probable que el funcionamiento general no resulte afectado seriamente.

Se describen en esta memoria las mutaciones sentido erróneo, mutaciones o sustituciones conservadoras.

40 La presente descripción se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos aislada o a una secuencia de polipéptidos con un 80% de identidad de secuencia con las secuencias de la cadena pesada variable (SEQ ID NO: 2) y/o cadena ligera variable (SEQ ID NO: 4) de HH1, en donde la variación de la secuencia son sustituciones conservadoras.

45 La presente descripción es la identidad de secuencia de 80% de identidad, tal como un 90% de identidad, un 91% de identidad, un 92% de identidad, un 93% de identidad, un 94% de identidad, un 95% de identidad, un 96% de identidad, un 97% de identidad, un 98% de identidad o un 99% de identidad y la variación de la secuencia son sustituciones conservadoras.

50 Con el fin de mejorar la etapa de radiomarcaje puede ser beneficioso introducir lisina extra, p. ej. en la porción Fc de HH1. Esto podría reducir la probabilidad de fijar quelantes de unión de lisina en los sitios de combinación del antígeno en el anticuerpo, reduciendo con ello el riesgo de comprometer la inmunoreactividad durante el radiomarcaje.

55 Métodos para introducir lisina, p. ej. en la porción Fc de HH1 se conocen en la técnica, p. ej. de Hemminki et al., 1995.

La presente descripción se refiere al radioinmunoconjugado de la presente invención que ha sido modificado por 10 Lys en la porción Fc de HH1, tal como 8 Lys, tal como 6 Lys, tal como 5 Lys, tal como 4 Lys, tal como 3 Lys, tal como 2 Lys, tal como 1 Lys.

60 Tratamiento

El uso terapéutico de una disolución farmacéutica de acuerdo con la presente descripción puede ser para el

tratamiento contra células malignas que expresan el antígeno CD37, incluyendo linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica.

5 Otros usos podrían ser el tratamiento de enfermedades autoinmunes y el tratamiento de efectos relacionados con el trasplante. La terapia podría basarse en radiación de partículas beta o radiación de partículas alfa o una combinación de éstas. La terapia podría administrarse como una monoterapia o en combinación con otras terapias, preferiblemente tratamientos estándares. Tales otras terapias pueden ser pre-tratamiento, cirugía, quimioterapia, inmunoterapia, terapia fotodinámica, radioinmunoterapia o una combinación de dos o más de éstos. Por administrarse se entiende infusión intravenosa o inyección intravenosa. Más específicamente, el radioinmunoconjugado de la presente invención se puede administrar directamente en una vena por una cánula periférica conectada a una cámara de goteo que evita la embolia de aire y permite una estimación del caudal en el paciente.

15 El radioinmunoconjugado se puede administrar de una manera repetida.

El radioinmunoconjugado podría administrarse de una manera repetida, pero con diferentes radionucleidos, p. ej., una radioinmunoterapia beta podría ser seguida por una radioinmunoterapia alfa, o viceversa.

20 Un aspecto de la presente invención se refiere al radioinmunoconjugado de la presente invención para uso en el tratamiento de malignidades de células B.

Una forma de realización de la presente invención se refiere al radioinmunoconjugado de la presente invención para uso de acuerdo con las reivindicaciones, administrado en combinación con o además de otras terapias.

25 En una forma de realización de la presente invención las otras terapias se seleccionan de pre-tratamiento, quimioterapia, terapia de anticuerpo monoclonal, cirugía, radioterapia y/o terapia fotodinámica de acuerdo con las reivindicaciones.

30 Las otras terapias pueden ser trasplante de médula ósea o trasplante y/o terapia con de células madre.

La otra terapia de acuerdo con las reivindicaciones puede comprender pretratamiento terapéutico utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD20 y/o anti-CD37 antes del tratamiento con el radioinmunoconjugado de la presente invención.

35 Un aspecto de la presente descripción se refiere a la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones para uso en un método para el tratamiento de una neoplasia maligna de células B seleccionada de linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica, que comprende la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención.

40 La dosificación de anticuerpo puede ser 1-1000 mg por paciente, más preferiblemente 5-50 mg por paciente, y <sup>177</sup>Lu que asciende a 1 - 200 MBq/kg, más preferiblemente a 10-100 MBq/kg de peso corporal.

#### Kits

45 Un aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la producción del radioinmunoconjugado de la presente invención que comprende dos o más viales, en donde un vial contiene un conjugado que comprende un quelante enlazado a un anticuerpo monoclonal murino HH1; y un segundo vial que contiene el radionucleido, de acuerdo con las reivindicaciones.

50 Un kit puede requerir realizar algunos procesos, p. ej. que tenga lugar un radiomarcaje y/o purificación antes de la infusión.

Una forma de realización de la presente invención se refiere a un kit de la presente invención, en el que el contenido de uno o varios de los viales está liofilizado o en una disolución.

55 Mezclando los contenidos de los dos viales para generar el radioinmunoconjugado aparecerá el producto final. Por lo tanto, el radioinmunoconjugado se puede generar mezclando el contenido de los dos viales. Este producto puede necesitar purificación antes de su uso.

#### 60 Ejemplos

Los Ejemplos que no están comprendidos en la materia objeto de las reivindicaciones no forman parte de la

presente invención y se citan como ejemplos de referencia.

#### Ejemplo 1 - Radiomarcaje de HH1

5 Yodación: Los anticuerpos fueron marcados con  $^{125}\text{I}$  a través de yodación indirecta utilizando tubos de yodación pre-revestidos IODOGEN (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con la descripción del fabricante.

Marcaje con  $^{111}\text{In}$  y  $^{177}\text{Lu}$ : Los anticuerpos se hicieron reaccionar en primer lugar con un quelante (p-SCN-Bn-DTPA o p-SCN-Bn-DOTA).

10 El quelante DTPA o DOTA se disolvió en HCl 0,05 M, y después se añadió al anticuerpo, que se ajustó a pH aprox. 8 por lavado con tampón carbonato, en una relación de 5:1. A continuación, el pH se comprobó de nuevo y, en caso necesario, se ajustó. La disolución se agitó durante 60 min a temperatura ambiente, y después la reacción se terminó añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de disolución de glicina 200 mM (por mg de anticuerpo). Para separar quelante libre, el anticuerpo conjugado se lavó 4-5 veces con PBS (PAA), y después se ajustó a pH 5 por lavado con acetato de amonio.  $^{111}\text{In}$  o  $^{177}\text{Lu}$  (Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.) se añadió a continuación a 0,5 mg de DOTA-Ab y se agitó durante una hora a 42°C. Finalmente, el producto se purificó por elución en una columna de filtración en gel, p. ej. Sephadex G-25 PD10 (GE health) o similar. El rendimiento global de marcaje varió de 17% a 63%.

20 La calidad de los radioinmunoconjugados se midió utilizando células de linfoma y un método de Lindmo modificado. Se utilizaron concentraciones de células de hasta 108 células por ml para compensar la modesta actividad específica de conjugados de  $^{111}\text{In}$ . Para conjugados de  $^{125}\text{I}$  (que tienen una actividad específica más alta) fue suficiente con utilizar concentraciones de células de hasta  $4 \cdot 10^7$  células por ml.

25 La inmunorreactividad y la actividad específica para los radioinmunoconjugados se pueden ver en la Tabla 1.

#### Ejemplo 2 - Parámetros de unión

30 La constante de la tasa de asociación,  $k_a$ , la constante de disociación en equilibrio,  $K_d$ , y el número medio de sitios de unión,  $B_{\text{máx}}$ , se determinaron por un método de ajuste de curva de una sola etapa (Dahle et al. 2007). Se midieron los parámetros de unión para HH1 y rituximab y para tres líneas celulares diferentes de linfoma; células Raji, Rael y Daudi (Tabla 2). La unión específica se midió como una función del tiempo y de la concentración de anticuerpos, y la solución de la ecuación diferencial que describe la tasa neta de formación del complejo antígeno-anticuerpo se ajustó a los puntos de datos experimentales utilizando la constante de la tasa de asociación,  $k_a$ , la constante de disociación en equilibrio,  $K_d$  y el número medio de sitios de unión,  $B_{\text{máx}}$ , como parámetros. Se utilizaron cinco millones de células por ml, cuatro concentraciones de anticuerpo marcado con  $^{125}\text{I}$  (100 ng/ml, 1000 ng/ml, 5000 ng/ml y 10000 ng/ml) y 7 instantes de incubación (5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 1,5 h y 2 h). Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS, y luego se contaron en un contador gamma.

#### Ejemplo 3 – Retención de anticuerpos unidos a células

45 La retención de anticuerpos unido a células se midió inmediatamente y 96 horas después del lavado después de la incubación de células Raji, Rael y Daudi con  $^{111}\text{In}$ -HH1,  $^{111}\text{In}$ -rituximab,  $^{125}\text{I}$ -HH1 y  $^{125}\text{I}$ -rituximab (Figura 1).

50 Un millón de células en 1 ml de medio RPMI 1640 con suero de ternero fetal al 10%, L-glutamina al 1% y penicilina/estreptomicina al 1% se incubaron con 1  $\mu\text{g/ml}$  de HH1 marcado con  $^{125}\text{I}$  o  $^{111}\text{In}$  o rituximab durante una hora, se lavaron dos veces con medio y se incubaron adicionalmente durante cuatro días. La actividad ligada a la célula se determinó inmediatamente después de lavar (Figura 1A) y después de cuatro días de incubación (Figura 1B) midiendo el número de células (analizador Vi Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) y la cantidad de radiactividad con un detector gamma calibrado (detector Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company, Meriden, CT, EE.UU.).

#### Ejemplo 4 - Tratamiento de células de linfoma in vitro con $^{177}\text{Lu}$ -HH1 o $^{177}\text{Lu}$ -rituximab

##### 55 *Experimento I: Unión de $^{177}\text{Lu}$ -HH1 a células Daudi*

60 Un ml de suspensión de células Daudi (1 millón de células/ml) se sembró en 24 tubos y la mitad de los tubos se bloquearon con 100  $\mu\text{g/ml}$  de HH1 o rituximab y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió a cada uno de los tubos  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 o  $^{177}\text{Lu}$ -Lu rituximab a una concentración final de 0, 1, 2,5, 5, 10 o 20  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron adicionalmente a 37°C. La actividad específica era de 91,6 kBq/ $\mu\text{g}$  para  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 y de 136,6 kBq/g para  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab.

5 La cantidad de actividad agregada se midió durante el periodo de incubación con un detector de rayos gamma (detector Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company). Después de 2 horas, se lavó la mitad de las células y se midió la actividad ligada a las células (Figura 2A), mientras que la mitad de las células se incubaron durante la noche (18 h) antes del lavado y la medición de la actividad ligada a las células (Figura 2B).

10 No hubo diferencias entre las células incubadas con HH1 y las células incubadas con rituximab después de 2 horas de incubación, mientras que la actividad ligada a la célula era dos veces mayor para las células incubadas con rituximab que para las células incubadas con HH1 después de incubación durante 18 horas (Figura 2).

Las Tablas 3 y 4 indican que HH1 radiomarcado satura el antígeno más rápido y en la concentración de anticuerpo más baja que rituximab. La unión no específica parece ser similar para los dos radioinmunoconjugados (RIC), y se incrementa al aumentar la concentración de RIC en el medio.

15 El número máximo de  $^{177}\text{Lu}$  ligado específico era aproximadamente dos veces mayor para rituximab que para HH1. Sin embargo, a la dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$ , casi no había diferencias en el número de átomos radiactivos unidos específicamente.

20 *Experimento II: Incubación durante dos horas con  $^{177}\text{Lu}$ -IgG: datos de crecimiento de las células*

Células Daudi se incubaron con radioinmunoconjugados como en el experimento I (Figura 2A).

25 El crecimiento de células Daudi después de 2 horas de incubación con  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 o  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab se midió mediante la siembra de 50.000 células de cada uno de los tubos en tres pozos en seis placas de 12 pocillos. La cantidad de células se midió durante varios instantes de los próximos 14 días utilizando un sistema de formación de imágenes automático (Clone Seleccionar Imager, GENTIX Ltd, Hampshire, Reino Unido).

30 No hubo efecto de anticuerpo no marcado solo en el crecimiento celular. Sin embargo, las células bloqueadas tratadas con anticuerpo marcado con  $^{177}\text{Lu}$  claramente no crecieron tan rápido como las células control no tratadas, lo que indica que existía un efecto de anticuerpo marcado con  $^{177}\text{Lu}$  no ligado o de anticuerpo marcado con  $^{177}\text{Lu}$  ligado inespecíficamente en las células (Figura 3).

35 El tratamiento de células no bloqueados con anticuerpo marcado con  $^{177}\text{Lu}$  resultó en un aumento en el retraso del crecimiento de 44% para las células tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  de  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 (Figura 3 A) y de 31% para las células tratadas con 10  $\mu\text{g/ml}$   $^{177}\text{Lu}$ -rituximab (Figura 3 B).

40 Para el tratamiento con 20  $\mu\text{g/ml}$ , la diferencia entre los dos anticuerpos era incluso mayor, ya que no había crecimiento renovado de las células tratadas con  $^{177}\text{Lu}$ -HH1. Este resultado era inesperado, ya que las células fueron marcadas con la misma cantidad de anticuerpo (Figura 2 A).

45 *Experimento III: Incubación durante dieciocho horas con  $^{177}\text{Lu}$ -IgG: datos de crecimiento de las células.*

Células Daudi se incubaron con radioinmunoconjugados como en el experimento I (Figura 2 B). El crecimiento de células Daudi después de incubación durante 18 horas con  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 o  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab se midió mediante la siembra de 50.000 células de cada uno de los tubos en tres pocillos en seis placas de 12 pocillos.

50 La cantidad de células se midió durante varios instantes los próximos 14 días utilizando un sistema de formación de imágenes automático (Clone Select Imager, Gentix Ltd, Hampshire, Reino Unido). No hubo efecto de anticuerpo no marcado solo en el crecimiento celular.

55 La inhibición del crecimiento celular en las células bloqueadas tratados con anticuerpo marcado con  $^{177}\text{Lu}$  era más grande en este experimento (Figura 4) que en el experimento II (Figura 3) debido al tiempo de incubación incrementado de 16 horas con radioinmunoconjugado en el medio.

60 El tratamiento de células no bloqueados con anticuerpo marcado con  $^{177}\text{Lu}$  resultó en un aumento en el retraso del crecimiento de 107% para las células tratadas con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 (Figura 4 A) y de 52% para las células tratadas con 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab (Figura 4 B). Este resultado fue inesperado, ya que después de 18 h de incubación, las células marcadas con  $^{177}\text{Lu}$ -rituximab tenían el doble de actividad de las células ligadas a células marcadas con  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 (Figura 2 B).

Ejemplo 5 - Biodistribución de HH1

La biodistribución de HH1 marcado con  $^{111}\text{In}$  se estudió en ratones BALB/c-inmunológicamente deficientes (nu/nu) con xenoinjertos Daudi con un tamaño de 32-256 mm<sup>3</sup> al comienzo del estudio.

El radiomarcaje se realizó utilizando pSCN-Bz-DOTA como un agente quelante bifuncional para complejar el radionucleido y fijarlo al anticuerpo (véase el Ejemplo 1). La preparación se administró por inyección en la vena de la cola de 100 µl de disolución a cada uno de los animales.

Una actividad de 120 kBq se inyectó en cada uno de los animales. Se utilizaron cinco animales para cada instante. Las autopsias se realizaron después de dislocación cervical en varios instantes después de la inyección. Se determinó el peso de cada una de las muestras de tejido, y  $^{111}\text{In}$  se midió mediante un detector gamma calibrado (detector Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company, Meriden, CT, EE.UU.). Las muestras de los inyectados se utilizaron como referencias en los procesos de medición.

En la figura 5 se presentan la captación de  $^{111}\text{In}$ -HH1 24 horas después de la inyección de ratones con xenoinjertos Daudi y la biodistribución de los tejidos normales. El anticuerpo radiomarcado tiene una focalización y biodistribución del tumor relevante. El quelante-conjugado  $^{111}\text{In}$ -HH1 muestra buena estabilidad *in vivo*.

Ejemplo 6 - Comparación de HH1 con otros tres anticuerpos anti-CD37

*Experimento I: Capacidad de bloqueo del antígeno de anticuerpos anti-CD37 contra HH1 radiomarcado*

Para testar si la interacción HH1 antígeno puede ser bloqueada por otros anticuerpos anti-CD37, células Daudi se bloquearon mediante pre-incubación con cualquiera de anticuerpos HH1, O.N.108, IPO-24 o 6D263. Células Daudi (2 millones/ml) se incubaron durante 15 minutos, con cualquiera de anticuerpos HH1, O.N.108, IPO-24 o 6D263 (20 µg/ml) y se añadió anticuerpo HH1 marcado con  $^{125}\text{I}$  y se incubaron durante 1 hora.

Después de ello, las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces y las actividades en el sobrenadante y los sedimentos celulares se contaron usando un contador de rayos X/gamma. En comparación con las células bloqueadas con HH1, la fracción ligada de HH1 marcado con  $^{125}\text{I}$  era 48%, 44% y 51% más alta para células bloqueadas con O.N.108, IPO-24 o 6D263, respectivamente.

Por lo tanto, la unión al antígeno de  $^{125}\text{I}$ -HH1 era mejor bloqueada con HH1 que con los otros tres anticuerpos, sugiriendo algunas diferencias en la interacción con el antígeno. En conclusión, HH1 tiene importantes diferentes propiedades de unión al antígeno en comparación con un panel de otros tres anticuerpos monoclonales anti-CD37.

*Experimento II: La unión del anticuerpo a muestras de tejidos de linfoma embebidas en parafina*

Para comparar la capacidad de HH1 y tres anticuerpos CD37 comercialmente disponibles de unirse a las muestras de linfoma fijadas, biopsias de pacientes con linfoma fueron fijadas en formol, embebidas en parafina y cortadas en rodajas de 10 µm que fueron montados en objetivos.

Las muestras fueron marcadas con los anticuerpos HH1, IPO.24, ON.108 y 6D263 y el grado de marcaje se detectó utilizando anticuerpo policlonal anti-ratón de conejo y tinción con peroxidasa.

Los anticuerpos IPO.24 y ON.108 dieron como resultado el marcaje más fuerte de las muestras de linfoma. El anticuerpo 6D263 marcaba la muestra de forma un poco más débil. El marcaje de anticuerpos HH1 de las secciones fue insignificante.

Por lo tanto, se puede concluir, dado que HH1 no se unía, mientras que se unían otros tres anticuerpos anti-CD37, que HH1 tiene una interacción con el antígeno significativamente diferente.

*Experimento III: Citometría de flujo de anticuerpos HH1, IPO.24, ON.108 y 6D263*

Para investigar las diferencias en la expresión del antígeno detectada por los diferentes anticuerpos CD37 frente a HH1, células Daudi se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 con suero de ternero fetal al 5% y se marcó con 10 µg/ml de los anticuerpos primarios HH1, IPO.24, ON.108 y 6D363 durante 0,5 horas en 0,2 ml de medio con FCS al 10% en hielo.

Subsiguientemente, las células se lavaron dos veces con PBS con FCS al 0,25% y se marcaron con IgG Fab'2 anti-ratón de conejo policlonal marcado con FITC (diluido en la relación 1:20) (Figura 6) durante 0,5 horas en hielo. La fluorescencia del marcaje con FITC se detectó excitando con un láser de 488 nm en un citómetro de flujo.

Las células muertas y dobletes fueron identificadas y seleccionadas utilizando dispersión frontal, dispersión lateral

y señales de yoduro de propidio. No hubo variación significativa entre los diferentes histogramas FITC de los diversos anticuerpos CD37 (Figura 6).

5 En conclusión, HH1 y los otros tres anticuerpos anti-CD37 IPO.24, ON.108 y 6D363 producen histogramas de citometría de flujo similares.

*Experimento IV: La fracción de unión para HH1 y tres anticuerpos anti-CD37 comercialmente disponibles.*

10 Para comparar la fracción de unión de HH1 con los anticuerpos O.N.108, IPO-24 o 6D263 (Santa Cruz Biotechnology), utilizando células Daudi. Las suspensiones celulares, que representan un gran exceso de antígeno, consistentes en 60 millones de células Daudi en 0,2 ml de medio RPMI 1640 con suero de ternero fetal al 5% se bloquearon durante 15 minutos con HH1, O.N.108, IPO-24 o 6D263 anticuerpos (500 µg/ml) para justificar la unión no específica del anticuerpo. Otros paralelos se desbloquearon.

15 Posteriormente, se añadió anticuerpo HH1, O.N.108, IPO-24 o 6D263 marcado con <sup>125</sup>I (5-10 ng/ml) y las células se incubaron durante 2 horas a 4°C con suave agitación. Después de ello, las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con PBS con FCS al 1%. Los sedimentos celulares se transfirieron a tubos limpios y se contaron utilizando un contador gamma.

20 La fracción de unión se determinó como la diferencia en la actividad para los viales desbloqueados y bloqueados frente a la actividad añadida. El HH1 mostró una fracción de unión mucho más alta en comparación con los otros anticuerpos CD37 (Tabla 5). En conclusión, HH1 mostró una inmunorreactividad mucho mayor contra células vivas en comparación con IPO.24, ON.108 y 6D363 cuando los anticuerpos fueron radiomarcados de manera similar. Este resultado indica que HH1 tiene una interacción con el antígeno diferente a los otros tres anticuerpos.

25 Ejemplo 7 - Secuencia de ADN y de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada

La secuencia del gen y la proteína de las regiones variables del anticuerpo anti-CD37 HH1 es la siguiente:

30 La secuencia del gen VH αCD37 corresponde a SEQ ID NO: 1 y la secuencia de proteína VH αCD37 corresponde a SEQ ID NO: 2.

*VH αCD37*

```

gagatccagctgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaaggta
E I Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K V
tcttgcaaggcttctggttactcattcactgactacaacatgtactgggtgaagcagagc
S C K A S G Y S F T D Y N M Y W V K Q S
catggaaagagccttgagtggttgatataatgatccttacaatggtgatactacctac
H G K S L E W I G Y I D P Y N G D T T Y
aaccagaagttcaagggaaggccacattgactggttgacaagtcctccagcacagccttc
N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A F
atccatctcaacagcctgacatctgaggactctgcagctctattactgtgcaagatcccct
I H L N S L T S E D S A V Y Y C A R S P
tatggtcactatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
Y G H Y A M D Y W G Q G T S V T V S S
    
```

35 La secuencia del gen VL αCD37 corresponde a SEQ ID NO: 3 y la secuencia de la proteína VL αCD37 corresponde

a SEQ ID NO: 4.

VL  $\alpha$ CD37

gacattgtgatgaccagtcctcaciaactcttgtccacatcagtaggagacagggtcagc  
 D I V M T Q S H K L L S T S V G D R V S  
 atcacctgcaaggccagtcaggatgtgagtactgctgtagactggatcaacagaaacca  
 I T C K A S Q D V S T A V D W Y Q Q K P  
 ggacaatctcctaaactactgattaactgggcatccaccggcacactggagtcctgat  
 G Q S P K L L I N W A S T R H T G V P D  
 cgcttcacaggcagtgatctgggacagattatactctcaccatcagcagtatgcaggct  
 R F T G S G S G T D Y T L T I S S M Q A  
 gaagacctggcactttattactgtcgacaacattatagcactccattcacgcttcggctcg  
 E D L A L Y Y C R Q H Y S T P F T F G S  
 ggacaaaagttggaaataaaa  
 G T K L E I K

5 La secuencia de aminoácidos es significativamente diferente de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de unión a CD37 A0 (Heider et al., 2009). El solapamiento entre la cadena ligera variable de HH1 y A0 es de 56%, mientras que el solapamiento entre la cadena pesada variable es de 82%.

Ejemplo 8 - Unión de HH1 radiomarcado en células saturados con el anticuerpo CD20 rituximab.

10 *Fondo*

Pacientes con linfoma no-Hodgkin reciben a menudo rituximab como una terapia estándar. Sería ventajoso que HH1 radiomarcado pudiera utilizarse en pacientes incluso si éstos están siendo sometidos a una terapia con rituximab. Células de linfoma de Daudi, que expresan tanto los antígenos CD20 como CD37, se utilizaron como modelo.

15

*Métodos*

20 Células de linfoma Daudi (3,3 millones en 0,5 ml) fueron pre- y co-tratadas con cantidades excesivas (100  $\mu$ g/ml de rituximab) durante cinco minutos y después se añadió 1  $\mu$ g de HH1 marcado con  $^{125}$ I o se dio HH1 marcado con  $^{125}$ I sin pre-tratamiento con rituximab. Para determinar la unión no específica de  $^{125}$ I-HH1 se utilizó la misma configuración que antes, pero con pre-tratamiento con HH1 no marcado (se utilizaron 10  $\mu$ g/ml). Las células se incubaron durante dos horas en PBS a temperatura ambiente y se contaron en un contador gamma, se lavaron tres veces en 1 ml de PBS, seguido de centrifugación y, finalmente, se recontaron en cuanto a la radiactividad ligada a células.

25

*Resultados*

30 Con pre-tratamiento/co-tratamiento con rituximab, el 26,0% (unión total, 27,4% - unión no específica, 1,4%) del  $^{125}$ I-HH1 añadido se unía específicamente a las células.

Sin pre-tratamiento/co-tratamiento con rituximab, el 25,5% (26,9 -1,4) se unía específicamente (todos los números representan media de tres paralelas). Es decir, no hubo diferencia significativa en la unión de  $^{125}$ I-HH1 debido a la presencia de rituximab.

35

*Conclusión*

Pre- y co-tratamiento con cantidades excesivas de rituximab no alteraba la capacidad de unión de células de HH1 radiomarcado y, por lo tanto, no bloqueaba el acceso al antígeno CD37.

- 5 Esto indica que la radioinmunoterapia con HH1 radiomarcado puede ser adecuado en pacientes después de o durante la inmunoterapia con anticuerpos anti-CD20, así como en pacientes no tratados con rituximab.

Ejemplo 9 - Tratamiento de ratones SCID inoculados por vía intravenosa con células de linfoma de Daudi utilizando <sup>177</sup>Lu-HH1.

10

#### **Antecedentes**

15 El tratamiento de pacientes con linfoma con actual radioinmunoterapia dirigida contra CD20 puede ser problemático en pacientes previamente tratados con rituximab debido a la deriva antigénica y al posible bloqueo del antígeno CD20. Por lo tanto, la radioinmunoterapia que fija como objetivo otros antígenos puede ser más eficaz. Mediante inyección intravenosa de células de linfoma humano en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID – siglas en inglés) los autores de la invención hicieron un modelo de tumor intravenoso. Cuando ratones SCID se inoculan por vía intravenosa con células de linfoma de Daudi desarrollarán una parálisis de las patas traseras debido al crecimiento de las células tumorales Daudi.

20

#### **Parte Experimental**

25 A ratones SCID se les inyectaron por vía intravenosa 10 millones de células Daudi una semana antes de la administración de 50 ó 100 MBq/kg de <sup>177</sup>Lu-HH1, 50 µg de HH1, 50 µg de rituximab o NaCl. Los ratones fueron monitorizados en cuanto a la parálisis de las patas traseras y la pérdida de peso corporal, así como recuento de leucocitos cada dos semanas. La interrupción de la supervivencia exenta de síntomas fue utilizada como punto final. Para preparar el anticuerpo radiomarcado, HH1 se marcó primero con p-SCN-Bn-DOTA y se purificó. Tras el intercambio de tampón, se añadió <sup>177</sup>Lu (Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.) al DOTA-HH1, y se agitó durante 40 minutos a 40°C. La actividad específica era de aproximadamente 3200 MBq/mkg para el producto final. Cada una de las preparaciones se disolvió en disolución salina isotónica a un volumen de inyección total de 100 µl por animal.

30

#### **Resultados**

35 La mediana de la supervivencia libre de síntomas era de 26 días (intervalo de 21 a 33) para la disolución salina, 40 días (intervalo 23 a 44) para HH1 y 40 días (intervalo de 33 a 44) para rituximab (Figura 8). Para 50 kBq/kg de <sup>177</sup>Lu-HH1, el 80% de los animales estaban vivos después de 79 días. Dos de los ratones en el grupo de 100 kBq/g murieron antes que cualquiera de los animales en los grupos de disolución salina, y los recuentos de células de la sangre indicaron una radiotoxicidad. Un tercio de los animales en el grupo de 100 kBq/g murió el día 49. Los otros animales (70%) estaban vivos en el día 79. La supervivencia de los ratones tratados con <sup>177</sup>Lu-HH1 fue significativamente mayor que la supervivencia de los ratones tratados con NaCl, HH1 o Rituximab (p <0,005, Mann Whitney Log Rank Test)

40

#### **Conclusión**

45 Los datos demuestran que los grupos que recibieron <sup>177</sup>Lu-HH1 en dosis de 50 ó 100 kBq/g de p. c. tenían una supervivencia considerablemente mejor que los grupos que recibieron disolución salina o inmunoterapia, ya sea con HH1 o rituximab. Los datos de toxicidad indican que la actividad debe mantenerse por debajo de 100 kBq/g de p.c. Estos datos indican que <sup>177</sup>Lu-HH1 tiene propiedades relevantes para la radioinmunoterapia in vivo.

50

Ejemplo 10 - Biodistribución de <sup>177</sup>Lu-HH1 en ratones inmunológicamente deficientes con xenoinjertos tumorales que expresan CD37.

#### **Antecedentes**

55

Anticuerpo HH1 marcado con lutecio-177 se evaluó en cuanto a la distribución in vivo en el tejido y focalización del tumor.

#### **Proceso experimental**

60

Marcaje de anticuerpos con radionucleidos

El anticuerpo se marcó primero con el quelante de p-SCN-Bn-DOTA. DOTA se disolvió en HCl 0,05 M, se añadió al anticuerpo en una relación 5:1 y el pH se ajustó a 8-9 mediante lavado con tampón carbonato utilizando filtros de centrifuga Amicon (Millipore, EE.UU.) con un corte de peso molecular de 30 kDa.

- 5 El pH se comprobó de nuevo y si se ajustó en caso necesario. La disolución se agitó durante 60 min a temperatura ambiente, y después la reacción se terminó añadiendo 50  $\mu$ l de disolución de glicina 200 mM (por mg de anticuerpo). Para separar quelante libre, el anticuerpo conjugado se lavó 4-5 veces con PBS (PAA) (utilizando Amicon y centrifugación), y después se ajustó a pH 5 por lavado con acetato de amonio.  $^{177}\text{Lu}$  (Perkin Elmer, Boston, MA, EE.UU.) se combinó luego con 0,5 mg de DOTA-HH1 en un tubo de polipropileno de 2 ml (Eppendorf, Alemania), y se agitó durante una hora a 40°C. Las actividades específicas eran típicamente 25-120 MBq/kg para conjugados de  $^{177}\text{Lu}$ .

#### *Inmunoreactividad*

- 15 La calidad de los radioinmunoconjugados se midió utilizando células de linfoma y un método de Lindmo modificado. Se utilizaron concentraciones de células de hasta 108 células por ml. Los conjugados utilizados en los experimentos tenían inmunoreactividad por encima de 50%.

#### *Biodistribución de radioinmunoconjugados*

- 20 Biodistribuciones de  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 se determinaron en ratones macho BALB/c inmunológicamente deficientes (nu/nu) implantados con xenoinjertos tumorales de Daudi 1·1·1 mm tres semanas antes. Los preparados se administraron por inyección en la vena de la cola de 100  $\mu$ l de disolución en cada uno de los animales. Actividad media de 500 kBq por ratón para  $^{177}\text{Lu}$ -HH1. Se utilizaron de cuatro a cinco animales por cada instante. Las autopsias se realizaron después de dislocación cervical en diversos instantes después de la inyección. Se determinó el peso de cada una de las muestras de tejido y se midieron  $^{177}\text{Lu}$  mediante un detector gamma calibrado (detector Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company, Meriden, CT, EE.UU.). Las muestras de los inyectados se utilizaron como referencias en los procesos de medición.

#### *Resultados y discusión*

- 30 La captación y la retención de HH1 marcado con  $^{177}\text{Lu}$  y en tejidos normales de ratones hembras BALB/c inmunológicamente deficientes (nu/nu) con xenoinjertos de Daudi se presentan en la Figura 7. No hubo signos de redistribución de nucleidos desde/a cualesquiera órganos después de la captación inicial de radioinmunoconjugados, lo que indica que los radioinmunoconjugados se mantuvieron estables.

- 35 La inyección de  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 en ratones inmunológicamente deficientes con tumores mostró una baja absorción en los huesos. Se sabe que  $^{177}\text{Lu}$  libre se acumula en el hueso, por lo que este resultado indica que el radioinmunoconjugado era estable in vivo. La absorción en los tumores era significativamente mayor que en otros órganos en instantes posteriores.

Esto indica que  $^{177}\text{Lu}$  tiene una semivida relevante para la radioinmunoterapia utilizando el anticuerpo HH1.

- 45 Los datos de biodistribución de  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 muestran una absorción de tejido normal y un aclaramiento relevantes y una retención significativa en xenoinjertos tumorales que expresan CD37.

- El anticuerpo HH1 parece ser muy adecuado para la radioinmunoterapia. El conjugado  $^{177}\text{Lu}$ -HH1 parece particularmente adecuado, ya que se obtuvieron relaciones de tejido tumoral a tejido normal favorables antes de que decayera una fracción más grande del radionucleido.

50

**Tablas**

Tabla 1

5 Inmunorreactividad y actividad específica para los radioinmunoconjugados.

Radioinmunoconjugado	IRF <sup>1</sup> (%)	Actividad específica <sup>1</sup> (MBq / mg)	Nº ej.
<sup>125</sup> I-HH1	66 ± 17 (39-92)	75 ± 15 (51-104)	17
<sup>111</sup> In-HH1	66 ± 14 (51-78)	22 ± 12 (9-32)	3
<sup>177</sup> Lu-HH1	56	92	1
<sup>125</sup> I-rituximab	62 ± 6 (54-68)	69 ± 30 (34-118)	6
<sup>111</sup> In-rituximab	45	16	1
<sup>177</sup> Lu-rituximab	60	137	1

<sup>1</sup> Media ± DE (intervalo)

15

Tabla 2

El número medio de antígenos (B<sub>máx</sub>) en células Raji, Rael y Daudi, la constante de disociación en equilibrio (K<sub>d</sub>) y la constante de la tasa de asociación (k<sub>a</sub>) para los anticuerpos rituximab y HH1.

Anticuerpo	Línea celular	B <sub>máx</sub> (Ag/célula)	K <sub>d</sub> (nM)	k <sub>a</sub> (nM/h)
HH1	Raji	146 000 ± 7 600	6,3 ± 1,7	0,36 ± 0,14
HH1	Rael	263 000 ± 27 000	12,7 ± 5,5	0,07 ± 0,01
HH1	Daudi	340 000 ± 5 000	2,7 ± 0,3	0,72 ± 0,07
rituximab	Rali	272 000 ± 69 000	4,8 ± 0,9	0,08 ± 0,006
rituximab	Rael	626 000 ± 36 000	12,0 ± 2,0	0,08 ± 0,007

25

Tabla 3

Número de átomos <sup>177</sup> Lu ligados por células Daudi después de 2 horas de incubación						
Dosificación de anticuerpo (µg/ml)	<sup>177</sup> Lu-HH1			<sup>177</sup> Lu-rituximab		
	Desbloqueo	Bloqueado	Específico	Desbloqueado	Bloqueado	Específico
0 <sup>a</sup>	12	7	5	8	53	-45
1	8318	449	7869	8554	372	8182
2,5	9105	720	8385	11629	885	10744
5	10025	1837	8188	13658	2019	11639
10	13646	3521	10125	17344	2769	14575
20	16290	8473	7812	30095	9709	20386

(<sup>a</sup> Los diferentes recuentos para las muestras control son indicativos de la variación en la radicación de fondo al contador).

Tabla 4

Número de átomos <sup>177</sup> Lu ligados por células Daudi después de 18 horas de incubación						
Dosificación de anticuerpo (µg/ml)	<sup>177</sup> Lu-HH1			<sup>177</sup> Lu-rituximab		
	Desbloqueado	Bloqueado	Específico	Desbloqueado	Bloqueado	Específico
0	12	5	7	10	53	-43
1	10327	301	10026	12831	356	12475
2,5	11757	787	10970	18836	1385	17451
5	12123	1857	10266	24097	1871	22226
10	11548	3205	8343	24249	2860	21389
20	15233	5445	9788	26639	5824	20815

30

Tabla 5

Encuadernación fracción de cuatro anticuerpos anti-CD37.

Anticuerpo	IRF
HH1	50%
ON108	24%
IPO-24	16%
6D263	21%

## Referencias

- 5 Bernstein ID, Eary JF, Badger CC, Press OW, Appelbaum FR, Martin PJ, Krohn KA, Nelp WB, Porter B, Fisher D, Miller R, Brown S, Levy R, Donnall Thomas E. High dose radiolabelled antibody therapy of lymphoma. *Cancer Res.* 1990, 50(3 Suppl), 1017s-1021s.
- 10 Brechbiel MW. Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008, 52 (2), 166-173.
- Buchegger F, Antonescu C, Delaloye AB, Helg C, Kovacsovic T, Kosinski M, Mach JP, Ketterer N. Long-term complete responses after 131I-tositumomab therapy for relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer.* 2006, 94(12), 1770-6.
- 15 Dahle, J., Krogh, C., Melhus, K. B., Kaalhus, O., Larsen, R. H. and Stokke, T. A one-step method for determining the maximum number of bound antibodies, and the affinity and association rate constant of antibody binding. *Nuclear Medicine Communications.* 2007, 28, 742-747.
- 20 Gordon LI, Molina A, Witzig T, Emmanouilides C, Raubitschek A, Darif M, Schilder RJ, Wiseman G, White CA. Durable responses after ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for CD20+ B-cell lymphoma: long-term followup of a phase 1/2 study. *Blood.* 2004, 103(12), 4429-31.
- 25 Grosmaire LS, Hayden-Ledbetter MS, Ledbetter JA, Thompson PA, Simon SA, Brady W. B-cell reduction using CD37-specific and CD20-specific binding molecules. documento US 2007/0059306 A1
- Heather A. Jacene, Ross Filice, Wayne Kasecamp, and Richard L. Wahl. Comparison of 90Y-Ibritumomab Tiuxetan and 131I-Tositumomab in Clinical Practice. *J Nucl Med.* 2007, 48, 1767-1776.
- 30 Heider KH, Borges E, Ostermann E. Anti CD37 antibodies. documento WO 2009/019312.
- Henriksen G, Funderud S, Hoff P. Bi-labelled antibody and Bi-labelled streptavidin. Comparison of targeting efficiency of a lymphoma cell line in vitro. *J Labelled Compds Radiopharm.* 1997, 34(12), 1039-1046.
- 35 Hemminki A., Hoffrén A-M., Takkinen K., Vehniäinen M., Mäkinen M-L., Pettersson K., Teleman O., Söderlund H., Teeri T.T.. Introduction of lysine residues on the light chain constant domain improves the labeling properties of a recombinant Fab fragment. *Protein Engineering.* Vol. 8, No. 2, pp. 185-191, 1995.
- 40 Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008, 60 (12), 1347-1370.
- 45 Ngo NT, Brodie C, Giles C, Horncastle D, Klammer M, Lampert IA, Rahemtulla A, Naresh KN. The significance of tumour cell immunophenotype in myeloma and its impact on clinical outcome. *J Clin Pathol.* 2009, 62(11), 1009-15.
- Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, Martin PJ, Badger CC, Nelp WB, Glenn S, Butchko G, Fisher D, Porter B, Matthews DC, Fisher LD, and Bernstein ID Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med.* 1993, 329(17), 1219-24.
- 50 Press OW, Leonard JP, Coiffier B, Levy R, Timmerman J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001, 221-40.
- Smeland E, Funderud S, Ruud E, Kiil Blomhoff H, Godal T. Characterization of two murine monoclonal antibodies reactive with human B cells. Their use in a high-yield, high-purity method for isolation of B cells and utilization of

such cells in an assay for B-cell stimulating factor. Scand J Immunol. 1985, 21(3), 205-14.

Kaminski et al., Journal of clinical oncology, vol. 10, no. 11, 1 November 1992, pages 1696-1711. documento WO 2009/019312, Boehringer Ingelheim Int.

**REIVINDICACIONES**

1. Un radioinmunoconjugado que une CD37 humano, que comprende:
  - a) anticuerpo monoclonal murino HH1,
  - b) un enlazador quelante y
  - c) un radionucleido seleccionado del grupo que consiste en  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{227}\text{Th}$  y  $^{90}\text{Y}$ .
2. El radioinmunoconjugado que une CD37 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el radionucleido es  $^{177}\text{Lu}$ .
3. Una composición farmacéutica que comprende un radioinmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y un soporte farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende, además, uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados adicionales.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados adicionales fijan como objetivo CD20.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, para uso en el tratamiento de células B malignas que expresan el antígeno CD37.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para uso en el tratamiento de linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica.
8. El radioinmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para uso en el tratamiento de malignidades de células B.
9. El radioinmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de malignidades de células B, en donde el radioinmunoconjugado se administra en combinación con o además de otra terapia.
10. El radioinmunoconjugado para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la terapia se selecciona de pre-tratamiento, quimioterapia, terapia de anticuerpos monoclonales, cirugía, radioterapia y/o terapia fotodinámica.
11. El radioinmunoconjugado para uso de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en donde la terapia comprende un pre-tratamiento utilizando anticuerpo monoclonal anti-CD20 y/o anti-CD37 antes del tratamiento con el radioinmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
12. Un kit para la producción del radioinmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende dos o más viales, en donde un vial contiene un conjugado que comprende un quelante enlazado a un anticuerpo monoclonal murino HH1; y un segundo vial que contiene el radionucleido de acuerdo con las reivindicaciones 1-2.
13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el contenido de uno o varios de los viales está liofilizado o en una disolución.

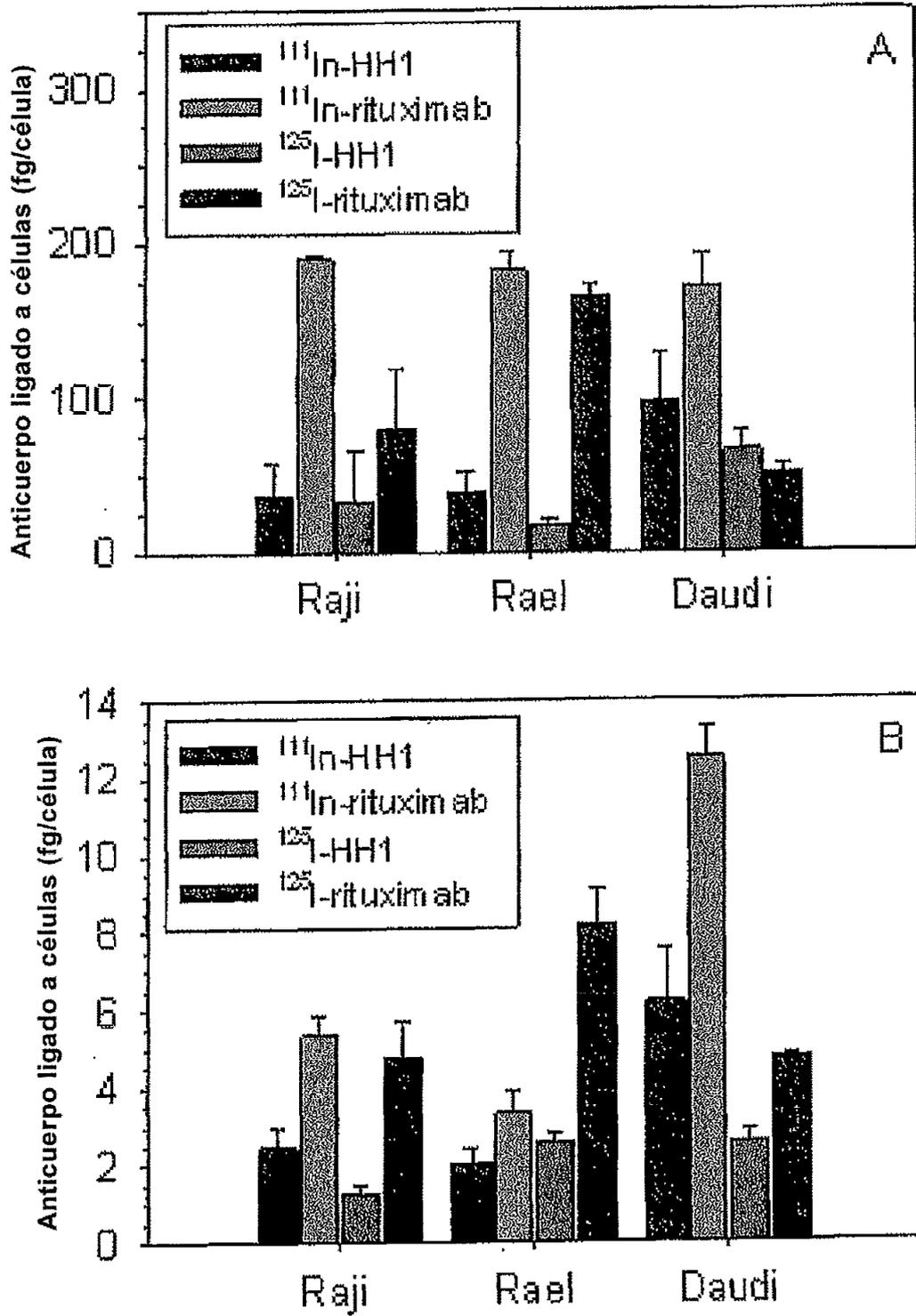


Fig. 1

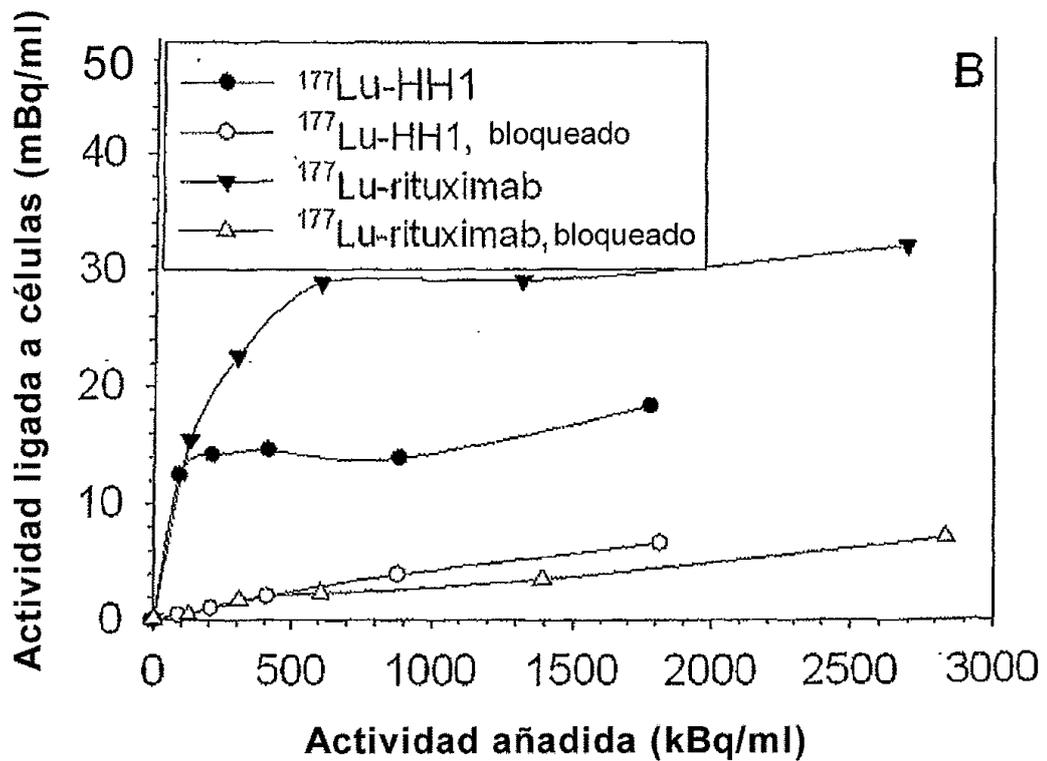
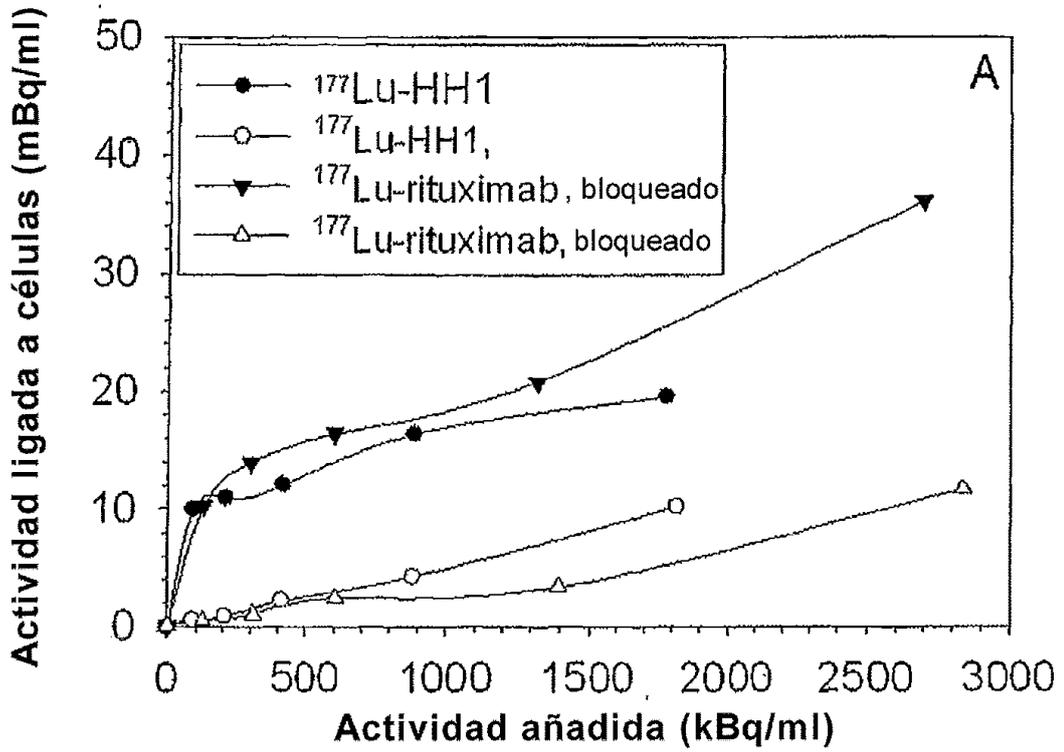


Fig. 2

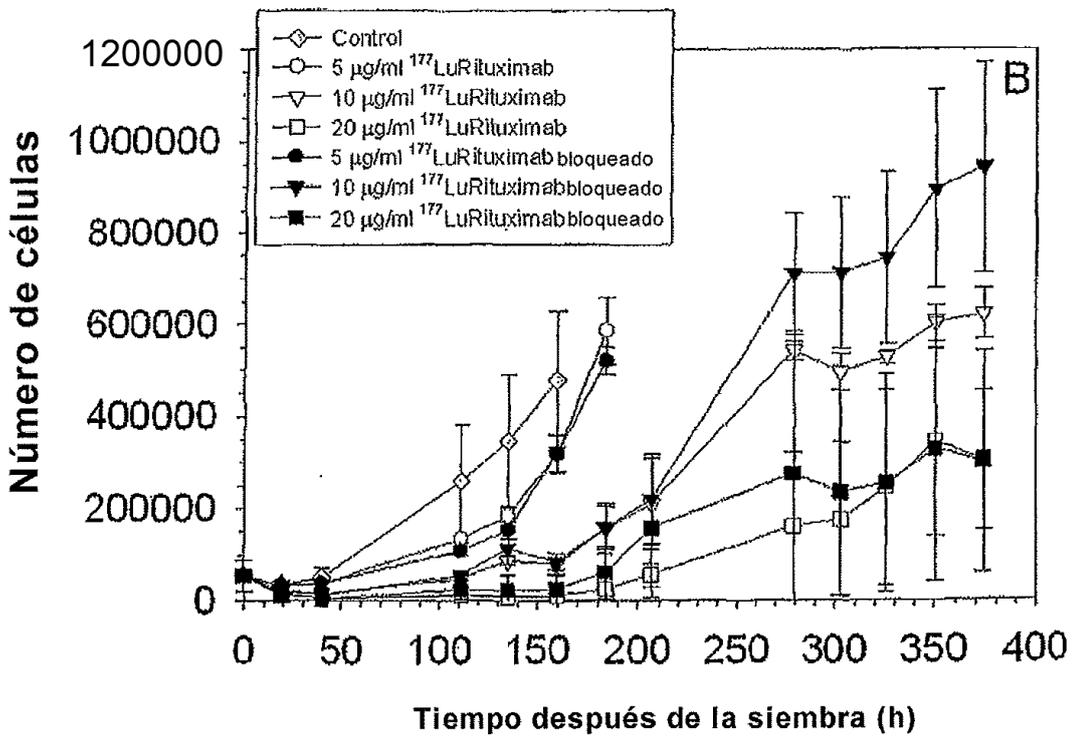
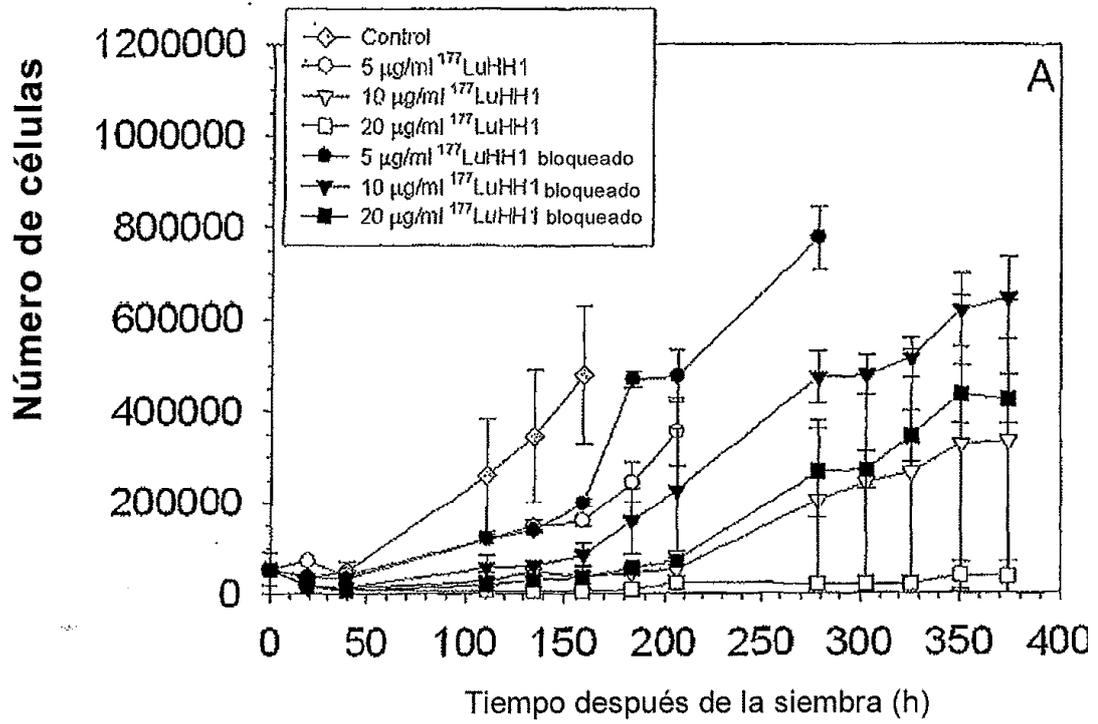


Fig. 3

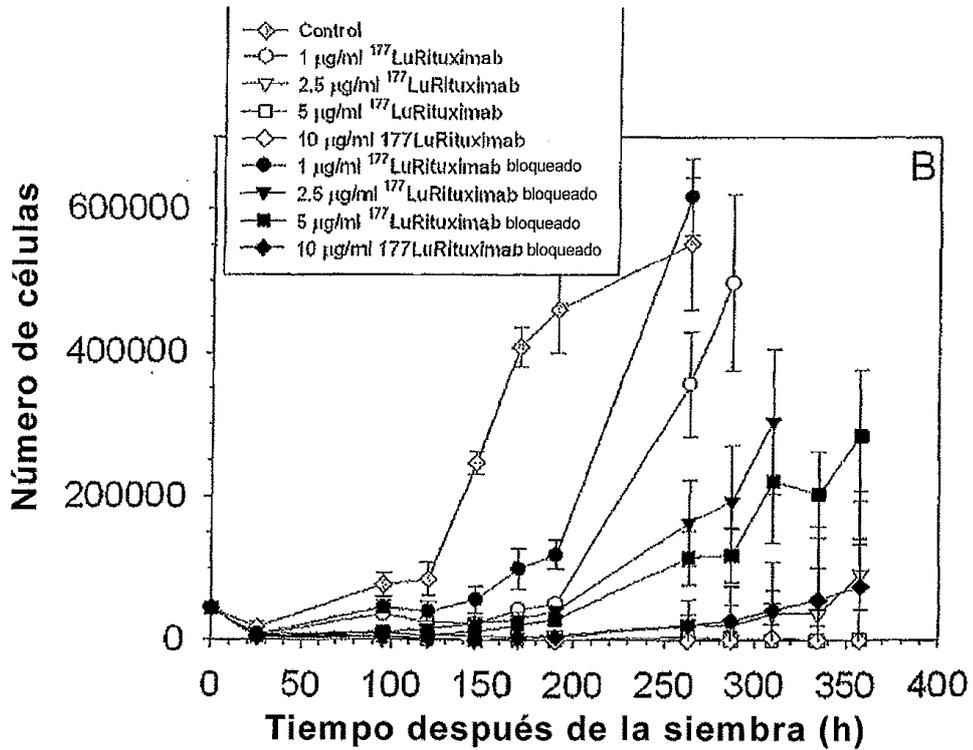
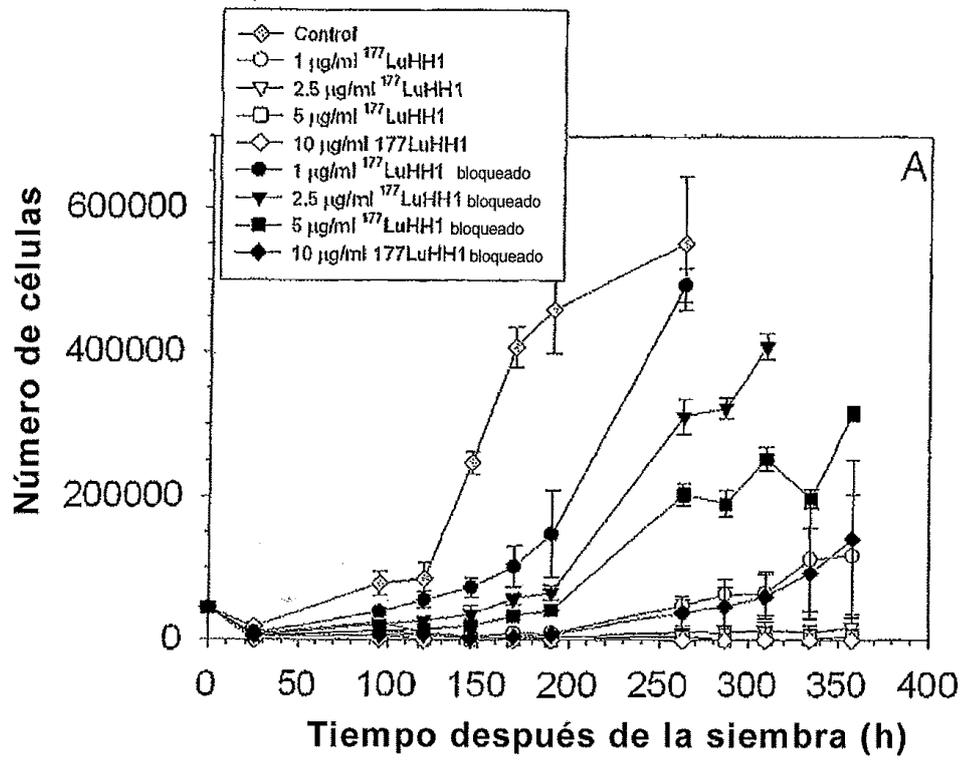


Fig. 4

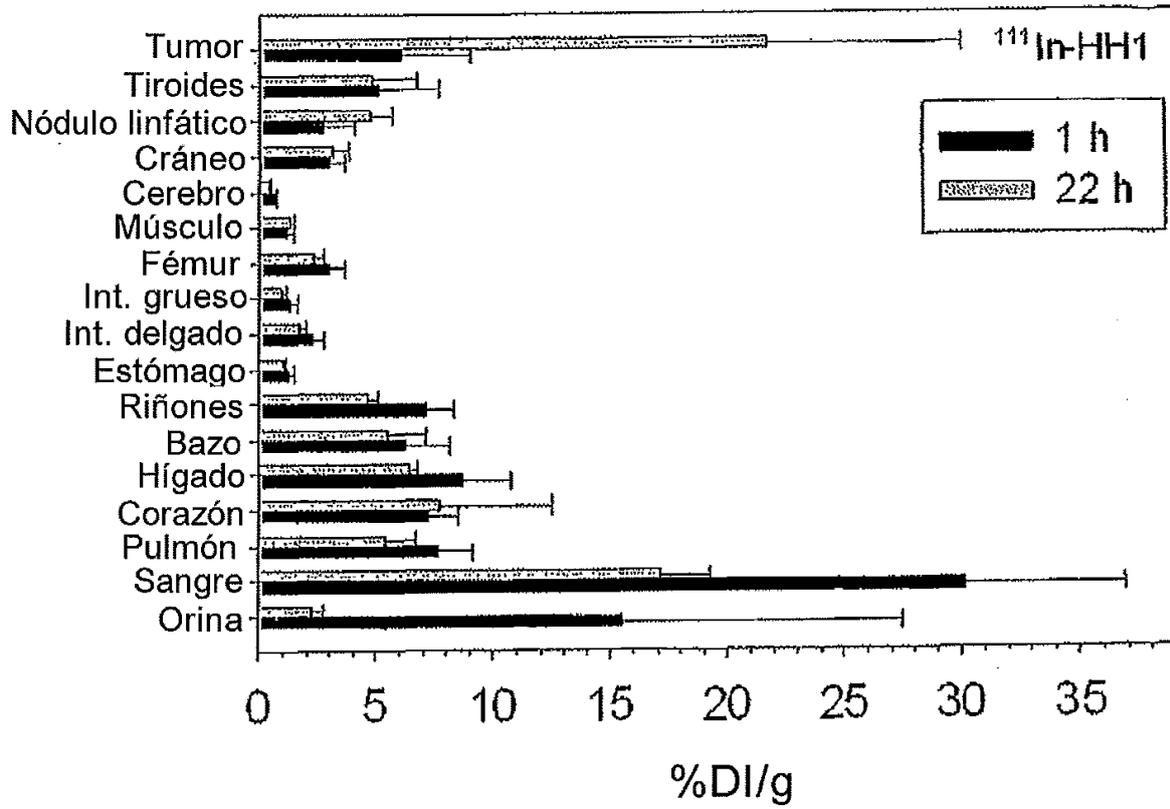


Fig. 5

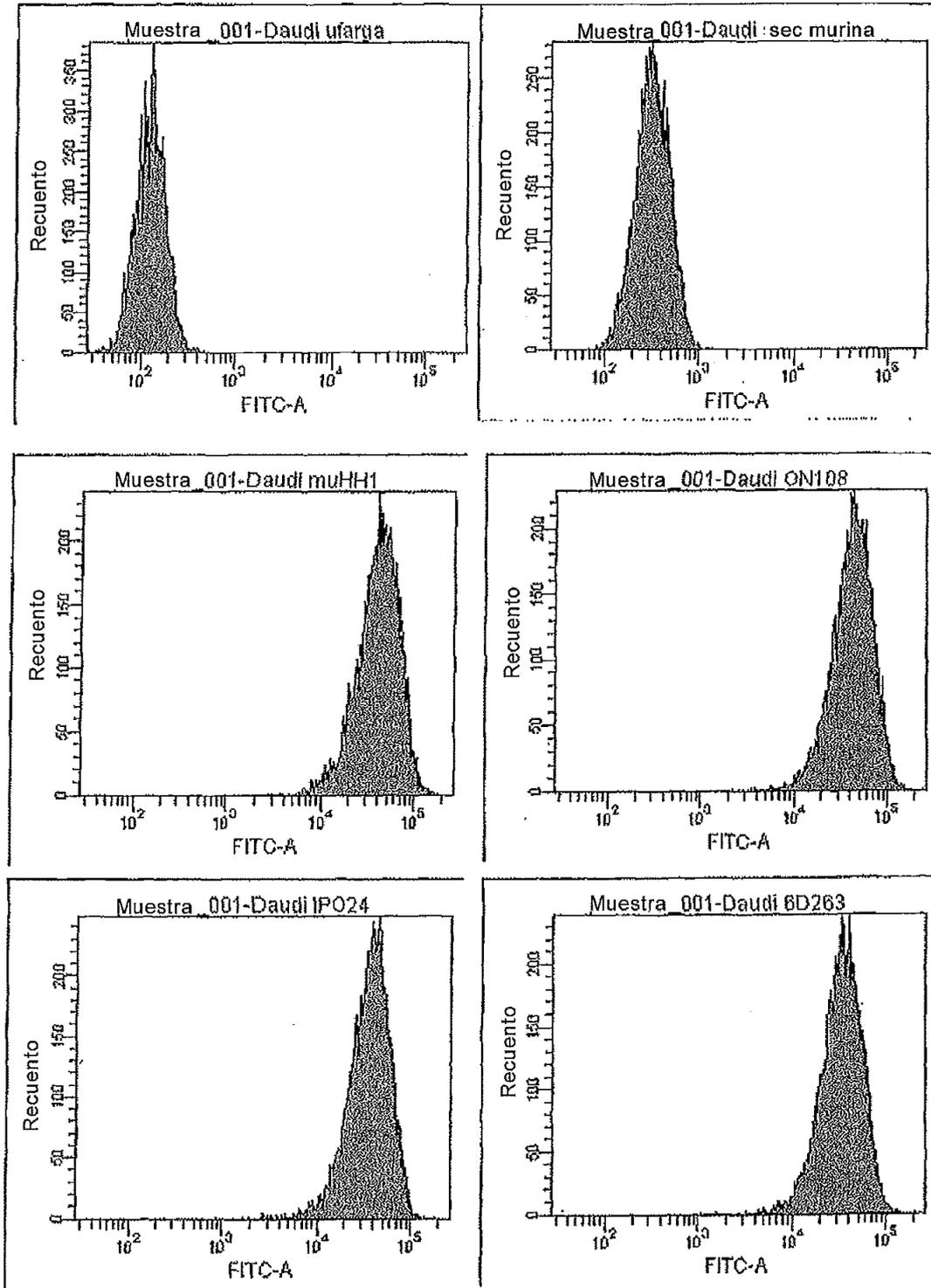


Fig. 6

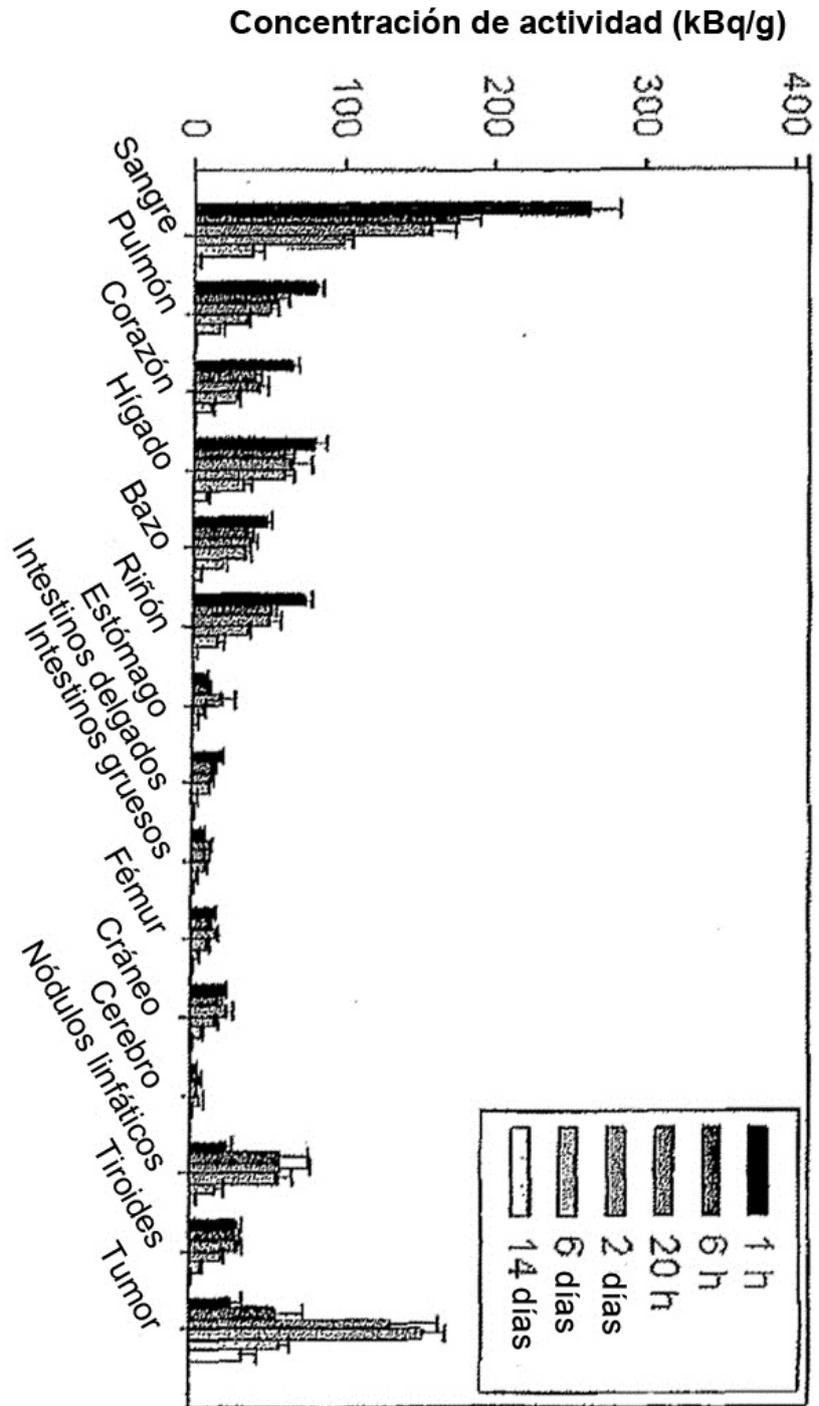


Fig. 7

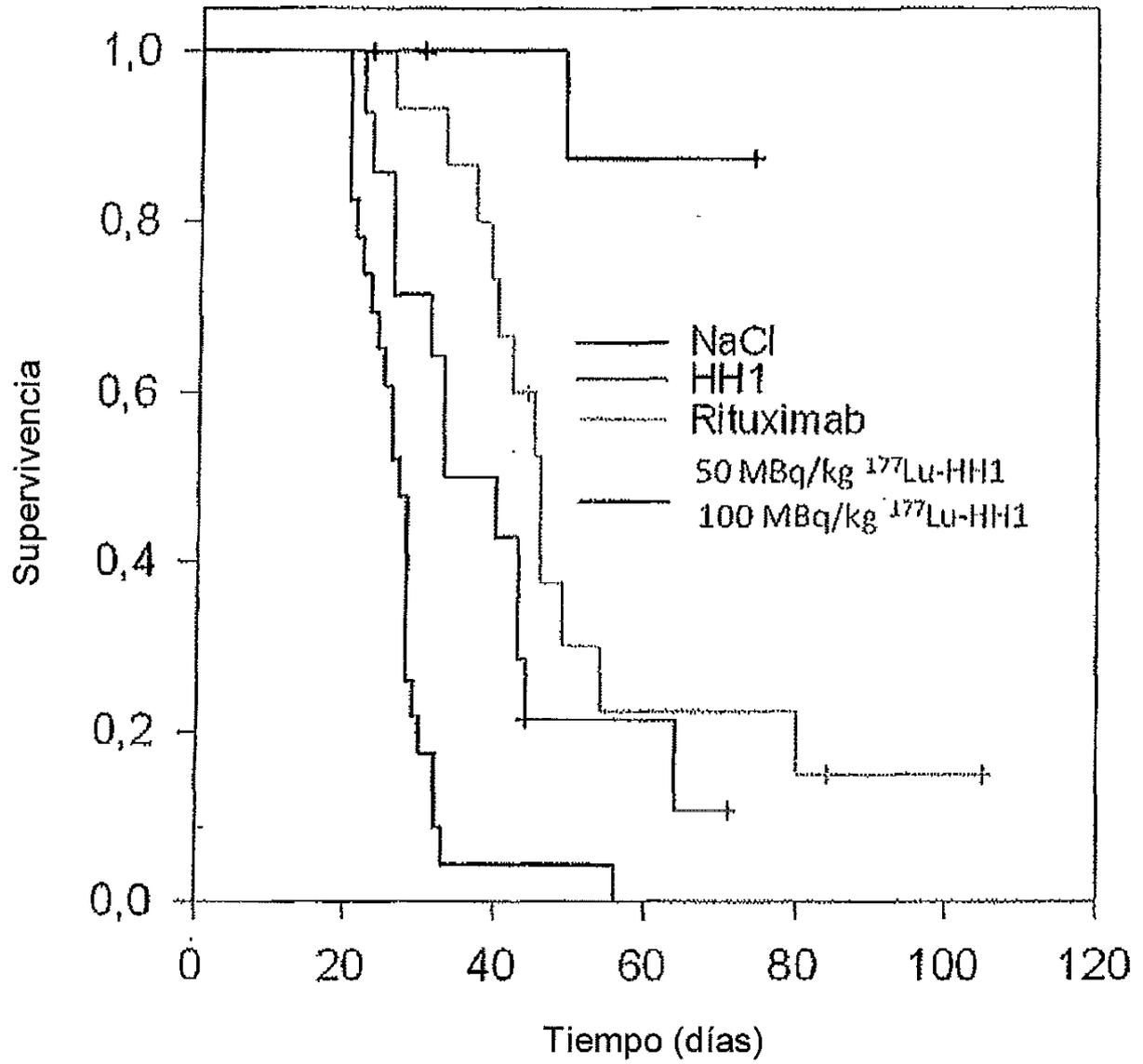


Fig. 8