

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 459**

51 Int. Cl.:

A61K 51/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/GB2012/052675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13061083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12798792 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2771037**

54 Título: **Agentes terapéuticos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

28.10.2011 US 201161552796 P

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

15.02.2017

73 Titular/es:

**FREDAX AB (100.0%)
Hans Jonas Väg
237 37 Bjärred, SE**

72 Inventor/es:

**STRAND, SVEN-ERIK;
TRAN, AMANDA THUY y
AXELSSON, SVEN-NIKLAS ANDERS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 601 459 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

Agentes terapéuticos y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de los agentes y los métodos terapéuticos, particularmente en el campo del cáncer de próstata.

10 Antecedentes

La enumeración o el análisis en la presente memoria descriptiva de un documento aparentemente publicado con anterioridad no deberían tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es conocimiento general común.

15 El cáncer de próstata es en la actualidad la forma más común de cáncer entre hombres. La próstata es una glándula del tamaño de una nuez en los hombres que produce un líquido que es un componente del semen. La próstata tiene dos o más lóbulos, o secciones, encerrados en una capa externa de tejido. La próstata se localiza en la parte frontal del resto y justo debajo de la vejiga urinaria, y rodea la uretra.

20 La frecuencia de cáncer de próstata es mayor en la parte noroeste de Europa y en los Estados Unidos. El crecimiento del tumor es habitualmente un proceso que tiene lugar durante un periodo de tiempo prolongado. El cáncer de próstata es normalmente una forma de cáncer leve. De hecho, la mayoría de los hombres a los que se les diagnostica cáncer de próstata sobreviven, y solamente una minoría de los hombres se encuentra con una forma más agresiva del cáncer de próstata, que metastatiza en un estadio temprano. Esta forma de cáncer de próstata solo puede curarse si se diagnostica en un estadio temprano, antes de que el cáncer se haya propagado al tejido extracapsular.

30 En la actualidad el diagnóstico y la supervisión del cáncer de próstata pueden realizarse midiendo la concentración de un antígeno específico de próstata (PSA) en la sangre del paciente. Si la concentración de PSA es notablemente alta en varias mediciones consecutivas, realizadas en momentos diferentes, la evaluación es que hay una probabilidad de cáncer de próstata. En este momento puede realizarse una biopsia para verificar el cáncer de próstata.

35 El PSA (también conocido como kaliceína III) es una proteína, constituida por una única cadena de 237 aminoácidos, que se produce en las células secretoras de la próstata. Estas células secretoras pueden encontrarse en la glándula prostática completa. PSA es un marcador bien establecido y exhaustivamente investigado con respecto al cáncer de próstata. En comparación con células sanas la producción de PSA es menor en células malignas y mayor en células hiperplásicas. Es por lo tanto contradictorio que de hecho la concentración de PSA es mayor en sangre de hombres que padecen cáncer de próstata. Sin embargo, una explicación puede ser que las células malignas tienen una estructura celular deteriorada, y por lo tanto son más permeables a PSA.

45 Otra serina proteasa importante, que puede ser adecuada para terapia futura del cáncer de próstata, es la kaliceína glandular humana 2 (hK2). El gen que codifica hK2 se localiza en el cromosoma 19, junto con el gen que codifica PSA. hK2 se expresa principalmente en el tejido prostático, al igual que PSA. En la próstata, PSA está presente como una proforma inactiva y se activa mediante la acción peptidasa de hK2. La investigación inmunohistoquímica con respecto a hK2 ha mostrado que hK2 se expresa en relación con el nivel de diferenciación. Esto significa que hK2 se expresa en un mayor rendimiento en tejido de baja diferenciación, tal como tejido sometido a cáncer de próstata, y en un menor rendimiento en tejido de alta diferenciación, tal como tejido sometido a hiperplasia prostática benigna (BPH) que es otro problema de próstata común.

50 Las terapias actuales de cáncer de próstata son cirugía (por ejemplo, prostatectomía radical), radioterapia (incluyendo braquiterapia y terapia de radiación de haz externo, ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, fármacos quimioterapéuticos orales, criocirugía (congelación del tumor), terapia hormonal (tal como terapia antiandrogénos), castración o combinaciones de las anteriores.

60 La mayoría de estas terapias (cirugía y radioterapia externa) son, sin embargo, solamente (o principalmente) útiles para el tratamiento de tumores primarios y metástasis grandes. Se usa quimioterapia para diseminación del cáncer pero para la mayoría de estos pacientes, es un efecto paliativo y/o supervivencia prolongada. Son por tanto necesarias modalidades de tratamiento distintas o complementarias para conseguir mejoras considerables de las enfermedades malignas diseminadas, particularmente en casos de micrometástasis.

65 La terapia, tal como inmunoterapia o radioinmunoterapia, usando moléculas de dirección tales como anticuerpos y fragmentos podría proporcionar la posibilidad de terapia de enfermedad diseminada.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos agentes y métodos terapéuticos para tratar cáncer de próstata, particularmente en casos de enfermedad diseminada, metástasis y micrometástasis.

5 Uno de los presentes inventores publicó un anuncio para becas en octubre de 2010 ("Doktorandplats i Medicinsk strålningsfysik", cita de internet, 5 de octubre de 2015, páginas 1-2, XP007921819), que describía un perfil de un proyecto de investigación en el campo de terapia de radionúclidos para cáncer de próstata usando anticuerpos anti-hK2.

10 **Sumario de la invención**

En consecuencia, la presente invención busca mitigar, aliviar o eliminar una o más de las deficiencias anteriormente identificadas en la técnica y desventajas individualmente o en cualquier combinación y resuelve al menos los problemas mencionados anteriormente proporcionando un método de terapia de acuerdo con las reivindicaciones de patente adjuntas.

15 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente que comprende o consiste en (a) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad por proteína kaliceína humana (hK2) y (b) un resto citotóxico para uso en el tratamiento de cáncer de próstata.

20 Dicho de otro modo, el primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un agente como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de próstata.

25 En consecuencia, el primer aspecto también proporciona un método para el tratamiento de cáncer de próstata en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, los agentes de la presente invención comprenden un resto de unión en forma de un anticuerpo anti-hK2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

30 Por "anticuerpo" se incluyen moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (en los que al menos un aminoácido está mutado en relación con los anticuerpos humanos de origen natural), anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno y derivados de los mismos.

35 Por "fragmento de unión a antígeno" se entiende "fragmento funcional de un anticuerpo que es capaz de unirse con una proteína kaliceína. La afinidad de unión de los diferentes derivados de anticuerpo mencionados anteriormente puede determinarse con el método de Scatchard usando una concentración fija de fragmento de anticuerpo inmovilizado y diversas concentraciones de indicador de Eu-PSA. Como alternativa, la afinidad de unión puede determinarse usando tecnología de resonancia de Plasmón Superficial (RPS) en un instrumento Biacore. Los métodos de análisis se describen adicionalmente en el Ejemplo 8.

45 En particular, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo, Fv monocatenario y Fv con enlaces disulfuro), fragmentos de tipo Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos F(ab)₂), dominios variables individuales (por ejemplo, dominios V_H y V_L) y anticuerpos de dominios (dAb, incluyendo formatos individuales y dobles [es decir, dAb-enlazador-dAb]).

50 Las ventajas de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos, son múltiples. El menor tamaño de los fragmentos puede conducir a propiedades farmacológicas mejoradas, tales como mejor penetración de tejido sólido y/o eliminación de la sangre más rápida lo que puede permitir relaciones terapéuticas mayores. Además, pueden expresarse fragmentos de unión a antígeno tales como fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb en y secretarse de microorganismos, tales como *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de grandes cantidades de dichos fragmentos.

55 También se incluyen dentro del alcance de la invención versiones modificadas de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, modificados por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado (véase posteriormente).

60 Se conocen bien en la técnica métodos para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos mediante uno cualquiera de varios métodos que emplean inducción de producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, exploración de bibliotecas de inmunoglobulina (Orlandi. *et al.*, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 3833-3837; Winter *et al.*, 1991, Nature 349: 293-299) o generación de moléculas de anticuerpos monoclonales mediante líneas celulares en cultivo. Estos incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos, y la técnica de hibridoma de virus de Epstein-Barr (VEB) (Kohler *et al.*, 1975. Nature 256: 4950497; Kozbor *et al.*, 1985. J. Immunol. Methods 81: 31-42; Cote *et al.*, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030; Cole *et al.*, 1984. Mol. Cell. Biol. 62: 109-120).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales adecuados para antígenos seleccionados por técnicas conocidas, por ejemplo, las desveladas en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

5 De forma similar, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Por ejemplo, pueden prepararse fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en células de *E. coli* o de mamífero (por ejemplo, cultivo celular de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Como
10 alternativa, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo mediante digestión con pepsina o papaina de anticuerpos completos por métodos convencionales.

Se apreciará por expertos en la materia que para terapia humana o diagnóstico, pueden usarse anticuerpos humanos o humanizados. Son formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) anticuerpos
15 quiméricos modificados por ingeniería genética o fragmentos de anticuerpo que tienen partes mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que se reemplazan regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) por restos de una región determinante de complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, se reemplazan restos de marco conservado de Fv del
20 anticuerpo humano por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias marco conservadas o de región determinante de complementariedad importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de complementariedad corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas, o
25 sustancialmente todas, la regiones marco conservadas corresponden a las de una secuencia consenso humana relevante. Los anticuerpos humanizados óptimamente también incluyen al menos una parte de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, normalmente derivada de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986. Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596).

30 Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. En general, el anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos, con frecuencia denominados restos importados, se toman normalmente de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente como se ha descrito (véase, por
35 ejemplo, Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522-525; Reichmann *et al.*, 1988. Nature 332: 323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, Science 239: 1534-15361; documento US 4.816.567) sustituyendo regiones determinantes de complementariedad humanas con regiones determinantes de complementariedad de roedores correspondientes. En consecuencia, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.
40 En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región determinante de complementariedad y posiblemente algunos restos marco conservados se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden identificarse usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* **227**:
45 381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* **222**: 581; Cole *et al.*, 1985, En: *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner *et al.*, 1991. *J. Immunol.* **147**: 86-95).

Una vez que se han obtenido anticuerpos adecuados, estos pueden ensayarse con respecto a actividad, por ejemplo
50 mediante ELISA.

En una realización alternativa del primer aspecto de la invención, el resto de unión comprende o consiste en un resto de unión distinto de inmunoglobulina, por ejemplo como se describe en Skerra, CurrOpin Biotechnol. Ago 2007;
55 18(4): 295-304.

En consecuencia, el resto de unión presente en el agente de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención se une con especificidad por una proteína kaliceína. En este contexto, la expresión "se une con especificidad" significa que el resto de unión se une selectivamente con la proteína kaliceína diana en preferencia a otras proteínas, opcionalmente incluyendo otras proteínas kaliceínas. El experto conoce bien numerosos métodos para
60 evaluar la especificidad de unión de una molécula de unión por una diana. Por ejemplo, cuando la molécula de unión es, o se basa en, un anticuerpo, su capacidad para unirse específicamente con una proteína kaliceína puede evaluarse mediante un inmunoensayo, tal como un ELISA, radioinmunoensayo o similares.

En una realización, puede decirse que el resto de unión se une con especificidad por una proteína kaliceína si se
65 une con la proteína kaliceína en un inmunoensayo y/o en condiciones fisiológicas (tales como condiciones halladas en la próstata u otros sitios para el tratamiento como se analiza en el presente documento) con una afinidad de

unión de más de 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 1×10^{11} o más, tal como dentro del intervalo de 1×10^5 a 3×10^{10} o más.

5 El resto de unión como se usa en el primer aspecto de la presente invención tiene especificidad por una proteína kaliceína humana. Una proteína kaliceína humana es una serina proteasa que pertenece a la familia del gen de kaliceína de tejido humano que se ha descubierto que consiste en al menos 15 miembros (Hsieh ML, Cancer Res 1997; 57; 2651-6). Las kaliceínas son glucoproteínas termoestables con una única cadena polipeptídica, con un PM que varía entre 27-40 kDa.

10 Específicamente, el resto de unión como se usa en el primer aspecto de la presente invención tiene especificidad por la kaliceína glandular humana (hK2).

15 En una realización, el resto de unión tiene especificidad por PSA. Se pretende que el término PSA incluya cada forma conocida de PSA, tal como que PSA libre, formas precursoras de PSA, formas con cortes internos de PSA, PSA libre de bajo peso molecular, PSA libre de peso convencional, PSA maduro inactivo, formas truncadas de PSA, variantes de glucosilación de PSA, BPSA, pro-PSA inactivo, y cada complejo de PSA, tal como PSA unido a α -1-antiquimotripsina (ACT), inhibidor de α 1-proteasa (API) y α 2-macroglobulina (AMG). Un aminoácido primario a modo de ejemplo de PSA se proporciona en la Fig. 14 (véase SEQ ID NO: 16).

20 PSA, secretado de células cancerosas, está en un estado más activo en comparación con PSA, secretado de tejido de BPH. En el fluido extracelular PSA puede someterse a degradación proteolítica, conduciendo de este modo a pérdida de activación y formación de complejos. Por lo tanto, también está dentro del alcance de la presente invención marcar compuestos o entidades, tales como ACT, API y AMG, unidos o en complejo con PSA.

25 En una realización preferida, el resto de unión tiene especificidad por la isoforma libre (es decir, no en complejo) de PSA en comparación con la isoforma en complejo de PSA. Los restos de unión con especificidad por la isoforma libre de PSA pueden tener especificidad de unión por un epítipo que se expone en la isoforma libre de PSA, pero no está expuesto en la isoforma en complejo de PSA, tal como un epítipo conformacional (es decir, no lineal). Un ejemplo de dicho epítipo conformacional se forma a partir de restos de aminoácidos que son parte del bucle de kaliceína que rodea la hendidura catalítica de PSA, y pueden incluir la tríada de sitio activo His41, Asn96 y Ser189). Véase, Leinonen *et al*, Clinical Chemistry 48: 12, 2208-2216 (2002) para análisis y divulgación adicional de numerosos epítopos adecuados en PSA, que se incorporan en el presente documento por referencia.

35 Cuando el resto de unión como se usa en el primer aspecto de la presente invención tiene especificidad por PSA, entonces el resto de unión puede competir por la unión con PSA (tal como la isoforma libre de PSA), o un péptido que comprende el epítipo reactivo de PSA como se une con el resto de unión, con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PSA30, 4D4, 5C3 y 5A10, y un fragmento de unión a antígeno del mismo. Puede encontrarse análisis adicional de dichos anticuerpos en Pettersson *et al*, Clin. Chem, 41: 10, 1480-1488 (1995); Nilsson *et al*, Brit. J. Cancer, 75: 6, 789-797 (1997); Leinonen *et al*, Clinical Chemistry 48: 12, 2208-2216 (2002); Väisänen *et al*, Anal. Chem., 78: 7809-7815 (2006); Evans-Axelsson *et al.*, Cancer Biother. Radiopharm. 27: 4, 243-51, documentos EP 1 320 756 B1; y US 2004/101914, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

45 Como está bien establecido en la técnica, los anticuerpos completos comprenden seis CDR, tres de las cuales están presentes en la cadena variable ligera (V_L), y las otras tres de las cuales están presentes en la cadena variable pesada (V_H).

Se conoce bien en la técnica que tres o menos regiones CDR (en algunos casos, incluso una única CDR o una parte de la misma) son capaces de conservar la actividad de unión a antígeno del anticuerpo del que derivan las CDR:

50 Laune *et al.* (1997), JBC, 272: 30937-44 - demuestra que una serie de hexapéptidos derivados de una CDR presentan afinidad de unión a antígeno (véase resumen) y observa que péptidos sintéticos de una única CDR completa presentan fuerte actividad de unión (véase página 30942, columna derecha).

55 Monnet *et al.* (1999), JBC, 274: 3789-96 - muestran que una serie de péptidos de 12 unidades y regiones marco conservadas asociadas tienen actividad de unión a antígeno (véase resumen) y comenta que un péptido de tipo CDR-3 solo es capaz de unirse con antígeno (véase página 3785, columna izquierda).

Qiu *et al.* (2007), Nature Biotechnology, 25: 921-9 - demuestra que una molécula que consiste en dos CDR unidas es capaz de unirse a antígeno (véase resumen y página 926, columna derecha).

60 Ladner *et al.* (2007), Nature Biotechnology, 25: 875-7 - en un artículo de revisión que informa de Qiu *et al.* (anteriormente) y que comenta que las moléculas que contienen dos CDR son capaces de conservar la actividad de unión a antígeno (véase página 875, columna derecha).

Heap *et al.* (2005), J. Gen. Virol., 86: 1791-1800 - indica que un "micro-anticuerpo" (una molécula que contiene una única CDR) es capaz de unirse con antígeno (véase resumen y página 1791, columna izquierda) y muestra que un péptido cíclico de un anticuerpo anti-VIH tiene actividad y función de unión a antígeno.

65 Nicaise *et al.* (2004) Protein Science, 13: 1882-91 - muestra que una única CDR puede conferir actividad de unión a antígeno y afinidad por su antígeno de lisozima.

Vaughan y Sollazzo (2001), Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 4: 417-430 - es un artículo

de revisión que describe minicuerpos que contienen menos de tres regiones CDR. Por ejemplo, en la página 418 (columna derecha – 3 Nuestra Estrategia para el Diseño) se describe un minicuerpo que incluye las regiones hipervariables CDR H1 y H2 intercaladas dentro de regiones marco conservadas. El minicuerpo se describe como capaz de unirse a una diana.

5 Quiocho (1993), *Nature*, 362: 293-4 - es un artículo de tipo revisión adicional que proporcionan un resumen de tecnología de minicuerpos (es decir, anticuerpos miniaturizados - en este caso con menos de tres CDR).

Pessi *et al* (1993), *Nature*, 362: 367-9 y Bianchi *et al* (1994), *J. Mol. Biol.*, 236: 649-59 - son artículos a los que se hace referencia en la revisión de Vaughan y Sollazzo y describen el minicuerpo H1 y H2 y sus propiedades en más detalle.

10 Gao *et al* (1994), *J. Biol. Chem.*, 269: 32389-93 que describe una cadena V_L completa (incluyendo las tres CDR) que tiene alta afinidad por su sustrato, el péptido intestinal vasoactivo, como prueba de que no es necesario tener las cadenas tanto V_H como V_L.

15 Estos documentos se publicaron antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud y por lo tanto estarían disponibles para el experto en la materia cuando implemente la presente mención. Proporcionan claras pruebas de que las moléculas que tienen menos de las seis CDR pueden ser capaces de conservar las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos de los que derivan.

20 Se pretende que el término hK2 incluya todas las formas isoméricas de hK2, y cualquier molécula o proteína en complejo con hK2. Una secuencia de hK2 a modo de ejemplo se describe como Transcrito: KLK2-201 (ENST00000325321), un producto del gen ENSG00000167751, como se proporciona en la base de datos de conjunto que puede encontrarse en la siguiente dirección web en:

25 ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_Protein?g=ENSG00000167751;r=19:51376689-51383822;t=ENST00000325321

y tiene la siguiente secuencia:

MWDLVLSIAL SVGCTGAVPL IQSRIVGGWE CEKHSQPWQV
 AVYSHGWAHC GGVLVHPQWV LTAAHCLKKN SQVWLGRHNL
 FEPEDTGQRV PVSHSFPHPL YNMSLLKHQS LRPDEDSSHD LMLLRLSEPA
 KITDVVKVLG LPTQEPALGT TCYASGWGSI EPEEFLRPRS LQCVSLHLLS
 NDMCARAYSE KVTEFMLCAG LWTGGKDT CG GDSSGGLVCN
 GVLQGITSWG PEPCALPEKP AVYTKVVHYR KWIKDTIAAN P [SEQ ID
 NO:3]

30 La mayoría de la hK2 hallada en plasma seminal está inactiva y en complejo con inhibidor de proteína C (PCI). También puede ser posible que hK2 forme complejos con otros inhibidores de proteasa extracelular. Los estudios *in vitro* muestran que hK2 puede unirse con α 2-antiplasmina (α 2-AP), ACT, AMG, anti-trombina III (ATIII), inactivador de C1 e inhibidor de activador de plasminógeno-1 (PAI-1).

35 Por lo tanto, también está dentro del alcance de la presente invención marcar compuestos, moléculas, proteínas o cualquiera otra entidad, tal como PCI, α 2-antiplasmina (α 2-AP), ACT, AMG, anti-trombina III (ATIII), inactivador de C1 e inhibidor de activador de plasminógeno-1 (PAI-1), unido o en complejo con hK2.

40 En una realización, el resto de unión puede tener especificidad por la isoforma libre (es decir, no en complejo) de hK2 en comparación con la isoforma en complejo de hK2. Los restos de unión con especificidad por la isoforma libre de hK2 pueden tener especificidad de unión por un epítipo que se ha expuesto en la isoforma libre de hK2, pero no está expuesto en la isoforma en complejo de hK2, y este puede ser un epítipo lineal o uno conformacional (es decir, no lineal). Por ejemplo, el resto de unión puede tener especificidad por un epítipo que incluye uno o más restos de aminoácidos que son partes de la hendidura catalítica de hK2 que está expuesta en hK2 libre y no expuesta en una isoforma en complejo, tal como la forma presente en líquido seminal cuando hK2 está en complejo con PCI. El mapeo epitópico de hK2 se describe en Väisänen *et al*, *Clinical Chemistry* 50: 9, 1607-1617 (2004), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia.

50 Cuando el resto de unión como se usa en el primer aspecto de la presente invención tiene especificidad por hK2, entonces el resto de unión puede competir por la unión por hK2, o un péptido que comprende el epítipo reactivo de hK2 como está unido por el resto de unión, con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 11 B6 y 7G1. Puede encontrarse análisis adicional de dichos anticuerpos en Väisänen *et al*, *Clinical Chemistry*, 50: 9, 1607-1617 (2004); y Väisänen *et al*, *Anal. Chem.*, 78: 7809-7815 (2006), cuyos contenidos se incorporan en el presente

documento por referencia.

La secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras constituyentes del anticuerpo anti-hK2 a modo de ejemplo 11 B6 se muestra posteriormente (en la que están subrayadas las secuencias de CDR).

5

Cadena pesada de 11B6

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGNSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTTYS
PSLKSRFSITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYFCATGYYYGSGFWGQGLVTVSS[SEQ ID
NO:4]

10 *Cadena ligera de 11B6*

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYFGTSLMHWYRQKPGQPPKLLIYAASNVES
 GVPARFSGSGSGTDFSLNIQPVEEDDFSMYFCQQTRKVPYTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO:5]

15 En este contexto, el término “compite” incluye el significado de que la presencia del agente que comprende el resto de unión en un ensayo competitivo junto con un anticuerpo de referencia seleccionado de 11 B6 y 7G1 puede reducir el nivel de unión detectable del anticuerpo de referencia con hK2 en 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (por ejemplo, cuando el agente y el anticuerpo de referencia están presentes en el ensayo en cantidades equimolares, y opcionalmente en el que el ensayo se realiza en condiciones fisiológicas). Dicho análisis puede realizarse mediante un ensayo inmunorradiométrico (IRMA) como se describe en el Ejemplo 9.

20

25 Cuando el resto de unión como se usa en el primer aspecto de la presente invención tiene especificidad por hK2, entonces el resto de unión puede comprender una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 11B6 y 7G1 (como se muestra por las secuencias subrayadas en las SEQ ID NO: 10 a 13 anteriores).

25

No es necesario que las moléculas de unión contengan las seis CDR de cualquiera de estos anticuerpos para conservar la actividad de unión de antígeno, aunque en una realización la molécula de unión puede comprender las seis CDR de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 11 B6 y 7G1.

30

Como alternativa, el resto de unión puede comprender menos de seis de las CDR, tales como

- cinco CDR (es decir, 3 CDR de la región V_H o V_L, 2 CDR de la otra región variable);
- cuatro CDR (es decir, 3 CDR de la región V_H o V_L, 1 CDR de la otra región variable; o 2 CDR de cada una de las regiones V_H o V_L);
- tres CDR (es decir, las tres CDR de una de las regiones V_H o V_L, y ninguna de la otra; o 2 CDR de la región V_H o V_L, 1 CDR de la otra región variable);
- dos CDR (es decir, dos CDR de una de las regiones V_H o V_L, y ninguna de la otra; o 1 CDR de cada una de las regiones V_H y V_L); o
- una CDR de una de las regiones V_H o V_L,

40

de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 11 B6 y 7G1.

45 En una realización preferida, cuando el resto de unión como se usa en el primer aspecto de la presente invención tiene especificidad por hK2, entonces el resto de unión es un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo, que comprende las seis CDR del anticuerpo anti-hK2 a modo de ejemplo 11 B6 (véase secuencias subrayadas de SEQ ID NO: 4 y 5).

45

50 En una realización alternativa, cuando el resto de unión como se usa en el primer aspecto de la presente tiene especificidad por hK2, entonces el resto de unión puede comprender o consistir en un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 11B6 y 7G1, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

50

El agente usado en el primer aspecto de la presente invención comprende además un resto terapéutico (citotóxico). El resto de unión puede unirse directa, o indirectamente, con el resto terapéutico.

55

60 En el caso de que el agente pueda comprender, o consistir, en un resto de unión como se ha descrito anteriormente y un resto terapéutico entonces el agente puede presentar características de captación tumoral, por ejemplo como se ensaya en las condiciones usadas en los ejemplos posteriores, sustancialmente equivalentes a las características de captación tumoral de un agente que consiste en el resto de unión solamente. En este contexto, sustancialmente equivalente incluye el significado de más de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o

60

sustancialmente 100 %.

Puede usarse cualquier resto terapéutico adecuado. Un resto terapéutico adecuado es uno que es capaz de reducir o inhibir el crecimiento de, o en particular destruir, una célula de cáncer prostática. Específicamente, el agente terapéutico es un resto citotóxico. Un resto citotóxico puede comprender o consistir en uno o más radioisótopos. Por ejemplo, el o los radioisótopos pueden seleccionarse cada uno independientemente del grupo que consiste en emisores beta, emisores de Auger, emisores de electrones de conversión, emisores alfa y emisores de baja energía fotónica. Puede desearse que el o los radioisótopos tengan independientemente cada uno un patrón de emisión de energía absorbida localmente que crea una alta dosis absorbida en las cercanías del agente. Los radioisótopos a modo de ejemplo pueden incluir emisores beta de largo alcance, tales como ^{90}Y , ^{32}P , $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$; ^{166}Ho , $^{76}\text{As}/^{77}\text{As}$, ^{89}Sr , ^{153}Sm ; emisores beta de medio alcance, tales como ^{131}I , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{161}Tb , ^{105}Rh ; emisores beta de baja energía, tales como ^{45}Ca o ^{35}S ; emisores de Auger o de conversión, tales como ^{51}Cr , ^{67}Ga , $^{99}\text{Tc}^m$, ^{111}In , ^{114m}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{201}Tl ; y emisores alfa, tales como ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ac , ^{225}Ac , ^{212}Pb , ^{255}Fm , ^{223}Ra , ^{149}Tb y ^{221}At . Pueden verse ejemplos adicionales de radionúclidos terapéuticos en la Fig. 9. Están disponibles otros radionúclidos y será posible usarlos para terapia. En otra realización, puede desearse que el resto terapéutico o resto citotóxico no sea un resto como se desvela como un "indicador" en el documento WO 2006/087374 A1, en particular en la página 11, líneas 7-15 del mismo.

En una realización preferida, el resto terapéutico es ^{177}Lu . Por ejemplo, el agente puede ser una forma marcada con ^{177}Lu de anticuerpo anti-hK2 11 B6, o de un fragmento de unión a antígeno o derivado del mismo.

Como alternativa, el resto terapéutico comprende o consiste en uno o más fármacos terapéuticos (tales como citotóxicos), por ejemplo, un fármaco citostático; un fármaco antiandrógeno; cortisona y derivados de la misma; un fosfonato; un inhibidor de testosterona-5- α -reductasa; una adición de boro; una citocina; tpsigargina y sus metabolitos; una toxina (tal como saporina o calicheamicina); un agente quimioterapéutico (tal como un antimetabolito); o cualquier otro fármaco terapéutico o citotóxico útil en el tratamiento de carcinoma prostático.

Los fármacos terapéuticos/citotóxicos a modo de ejemplo pueden incluir, por ejemplo:

- Citostáticos, en particular los que tienen efectos secundarios limitantes de la dosis, incluyendo pero sin limitación ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, busulfán, lomustina, taxanos, estramustina fosfato y otras mostazas de nitrógeno, antibióticos (incluyendo doxorubicina, calicheamicinas y esperamicina), alcaloides de la vinca, azaridinas, compuestos que contienen platino, endostatina, alquilsulfonatos, nitrosureas, triacenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, enzimas, urea sustituida, derivados de metil-hidrazina, daunorubicina, aminas anfipáticas,
- anti-andrógenos tales como flutamida y bicalutamida y metabolitos de los mismos;
- cortisona y derivados de la misma;
- fosfonatos tales como difosfonato y bufosfonato;
- inhibidores de testosterona-5- α -reductasa;
- adiciones de boro;
- citocinas;
- tpsigargina y sus metabolitos;
- otros agentes usados en el tratamiento de carcinoma prostático.

Como alternativa, el resto citotóxico comprende o consiste en uno o más restos adecuados para uso en la terapia de activación, tal como terapia de activación de fotones, terapia de activación de neutrones, terapia de electrones de Auger inducidos por neutrones, terapia de irradiación de sincrotrones o terapia de activación de fotones por rayos X de baja energía.

Por ejemplo, con los agentes de dirección a tumores de acuerdo con la presente invención habrá el potencial de usar radiación de sincrotrones (o rayos X de baja energía) para el avance de radioterapia, centrándose principalmente en la denominada radioterapia de fotoactivación (PAT), en la que la deposición de energía local de irradiación con rayos X externa se potencia en el tejido canceroso mediante la interacción con un agente de dirección a tumores de alto Z pre-administrado, véase Fig. 10.

La modalidad de tratamiento de PAT utiliza rayos X monocromáticos de una fuente sincrotrónica, tal como se proporciona por la línea de investigación biomédica ID17 en la Instalación de Radiación Sincrotrónica Europea (ESRF) en Grenoble, y como se anticipa que esté disponible en otras instalaciones en el futuro tales como la nueva instalación sincrotrónica sueca, Max-IV.

Como una modalidad de tratamiento potencial adicional, la investigación sobre "terapia tumoral de electrones de auger inducida", está la futura Fuente de Espalación Europea (ESS) en Lund, y se espera que una estación experimental médica. Se han usado durante mucho tiempo neutrones térmicos y semi-térmicos producidos por reactor para Terapia de Captura de Neutrones de Boro, BNCT, tanto para experimentos pre-clínicos como para tratamiento de tumores cerebrales con las partículas alfa inducidas y el núcleo de retroceso (^7Li) que proporcionan

una alta energía absorbida localmente. Un enfoque similar es usar neutrones y moléculas de dirección a tumores adecuadas marcadas con núcleos estables con alta sección transversal para neutrones. Los anticuerpos o péptidos pueden por ejemplo marcarse con Gadolinio estable (^{157}Gd) y actuar como la molécula diana para los neutrones que se capturan por el núcleo de Gd, denominada *Terapia de Captura de Neutrones de Gadolinio (GdNCT)*. Por técnicas de Monte Carlo, la distribución de dosis en el tumor y en los tejidos circundantes se calcula como resultado de fotones y, neutrones, retrocesos nucleares, así como rayos x característicos, conversión interna y electrones de Auger de gadolinio u otros elementos potenciales.

Como se ha mencionado anteriormente, el resto terapéutico (resto citotóxico) puede estar ligado directamente, o indirectamente, con el resto de unión (tal como un anticuerpo o fragmento del mismo). Se conocen en la técnica enlazadores adecuados e incluyen, por ejemplo, grupos prostáticos, enlazadores no fenólicos (derivados de N-succimidil-benzoatos; dodecaborato), restos quelantes de quelantes tanto macrocíclicos como acíclicos, tales como derivados de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10,tetraácético (DOTA), derivados de ácido dietilentriaminopentaácético (DTPA), derivados de ácido S-2-(4-isotiocianatobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) y derivados de ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecan-1,4,8,11-tetraácético (TETA) y otros restos quelantes. El uso de dichos enlazadores puede ser particularmente apropiado en circunstancias en las que el agente comprende o consiste en un anticuerpo o fragmento del mismo como el resto de unión unido, mediante un enlazador, con un radioisótopo como el resto terapéutico.

Un enlazador preferido es DTPA, por ejemplo como se usa en $^{177}\text{Lu-DTPA-11B6}$.

Opcionalmente, el agente usado en el primer aspecto de la presente invención puede comprender (o no) además un resto detectable. Por ejemplo, un resto detectable puede comprender o consistir en un radioisótopo, tal como un radioisótopo seleccionado del grupo que consiste en: Tecnecio-99m; Indio-111; Galio-67; Galio-68; Arsénico-72; circonio-89; Yodo-123, Yodo-124, Yodo-125; Talio-201. Opcionalmente, el agente puede comprender un par de radionúclidos detectables y citotóxicos, tales como $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ o $^{124}\text{I}/^{211}\text{At}$. Como alternativa, el agente puede comprender un radioisótopo que es capaz de actuar simultáneamente de una manera multi-modal como un resto detectable y también como un resto citotóxico para proporcionar el denominado "Tratanóstico de multimodalidad". Los restos de unión pueden acoplarse por lo tanto a nanopartículas que tienen la capacidad de captura de imágenes múltiples (por ejemplo, SPECT, PET, IRM, Óptica o Ultrasonidos) junto con capacidad terapéutico usando fármacos citotóxicos, tales como radionúclidos o agentes quimioterapéuticos. También se incluye con la presente invención la posibilidad de tratamiento mediante hipertermia usando campos magnéticos alternantes de alta frecuencia y captura de imágenes por ultrasonidos adjunta. Por ejemplo, véase Fig. 11.

Como alternativa, el resto detectable puede comprender o consistir en un isótopo paramagnético, tal como un isótopo paramagnético seleccionado del grupo que consiste en: gadolinio-157, manganeso-55, disprosio-162, cromo-52; hierro-56.

En el caso de que el agente usado en el primer aspecto de la presente invención comprenda un resto detectable, entonces el resto detectable puede ser detectable por una técnica de captura de imágenes tal como SPECT, PET, IRM, captura de imágenes óptica o de ultrasonidos.

Los restos terapéuticos y detectables pueden conjugarse o combinarse de otro modo con el resto de unión usando métodos bien conocidas en la técnica (por ejemplo, la terapia de inmunconjugados existente, gemtuzumab ozogamicina [nombre comercial: *Mylotarg*®], comprende un anticuerpo monoclonal unido a la citotoxina calicheamicina).

En una realización adicional, el agente usado de acuerdo con el primer aspecto de la invención se usa para tratar cáncer de próstata en forma de una formulación que comprende una población de moléculas agentes. En una opción, todas (o sustancialmente todas, tal como más de 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o más, en peso) de las moléculas agentes en la población usadas para el tratamiento comprenden el mismo resto terapéutico. En otra opción, la población comprende una mezcla de otros agentes con diferentes restos terapéuticos. Esta opción proporcionará posibilidades de potenciar los efectos de terapia de radionúclidos dirigida usando diversos agentes tales como agentes quimioterapéuticos, agentes de terapia hormonal u otra combinación de terapias en las que el agente de dirección no solamente suministra radionúclidos terapéuticamente activos a antígenos asociados a tumores sino también radiosensibiliza simultáneamente las células tumorales diana desencadenando una cascada de señalización intracelular. Esta opción también es útil en el tratamiento del cáncer de próstata con una mezcla de agentes citotóxicos, por ejemplo, usando un cóctel de emisores alfa y diferentes intervalos de emisores beta, o un cóctel de radionúclidos con diferente intervalo, LET (transferencia de energía lineal) y RB (efecto biológico relativo), para el tratamiento combinado de tumores grandes, micrometástasis y células tumorales individuales. En una realización, los emisores de largo alcance pueden usarse para el tratamiento de tumores grandes, y los emisores de corto alcance pueden usarse para tratamiento de tumores menores tales como micrometástasis y células tumorales individuales.

Opcionalmente, el agente usado en el primer aspecto de la presente invención puede comprender (o no) además un resto para aumentar la semivida *in vivo* del agente. Los restos a modo de ejemplo para aumentar la semivida *in vivo*

del agente pueden incluir polietilenglicol (PEG), albúmina de suero humano, grupos de glucosilación, ácidos grasos y dextrano. Puede contemplarse particularmente PEG.

5 En una realización de la invención, se inyectan/infunden en el cuerpo agentes que comprenden un agente de unión (por ejemplo, anticuerpo o fragmento del mismo) que son específicos para una proteína kaliceína, tales como PSA o hK2, y un agente terapéutico. Después el agente se une con tejidos que producen antígenos correspondientes, tales como PSA o hK2. Las estructuras biológicas, a las que se une el agente, pueden tratarse posteriormente con un agente adecuado y/o pueden usarse métodos de dosimetría y/o captura de imágenes de evaluación de terapia incluyendo PET/SPECT/CT/MR/Ópticos/Ultrasonidos.

10 En algunas circunstancias, las variaciones en el alcance de atenuación de células de cáncer de próstata por el agente pueden corresponder directamente a las relaciones de producción y concentración de la kaliceína diana (tal como PSA y hK2) en las células cancerosas prostáticas del paciente. Estas variaciones pueden determinarse, por ejemplo, por los métodos del documento WO 2006/08734, cuyos métodos se incorporan en el presente documento por referencia, y se usan para obtener información terapéutica.

15 Por ejemplo, pueden combinarse visualizaciones pre-terapéuticas de uniones a anticuerpos de PSA y hK2, obtenidas a partir de los métodos de captura de imágenes mencionados anteriormente, con los métodos y usos de la presente invención. A partir de la medición de atenuaciones es posible determinar directamente si el tejido investigado es productor de PSA, productor de hK2 o ambos. A la luz de esta determinación será posible adaptar la terapia para que sea más eficaz. Por lo tanto, puede conseguirse terapia individualizada para los pacientes con planificación de dosis pre-terapéutica. Puede tomarse orientación para terapia individualizada para pacientes de terapias conocidas en la técnica, tales como las analizadas en 1) Garkavij, *et al.* (2010) *Cancer*, 116: 1084-1092; (2) Linden, *et al.* (1999) *Clin.Cancer Res.*, 5: 3287s-3291s; (3) Ljungberg, *et al.* (2003) *Cancer Biother.Radiopharm.*, 18: 99-107; (4) Minarik, *et al.* (2010) *J.Nucl.Med.*, 51: 1974-1978; (5) Sjogreen-Gleisner, *et al.* (2011) *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 55: 126-154; y (6) Sjogreen, *et al.* (2005) *Cancer Biother. Radiopharm*, 20: 92-97; cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

20 En consecuencia, en una realización, el primer aspecto de la invención implica tratar a un paciente que se ha determinado que posee células cancerosas prostáticas productoras de PSA con un agente de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención que tiene especificidad por PSA.

25 En otra realización, el primer aspecto de la invención implica tratar a un paciente que se ha determinado que posee células cancerosas prostáticas que producen hK2 con un agente de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención que tiene especificidad por kaliceína glandular humana (hK2).

30 En otra realización, el primer aspecto de la invención implica tratar a un paciente que se ha determinado que posee células cancerosas prostáticas que son tanto productoras de PSA como productoras de hK2, con un agente de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención que tiene especificidad tanto por PSA como por kaliceína glandular humana (hK2), o una combinación de agentes uno de los cuales posee especificidad por PSA y el otro que posee especificidad por hK2. En el caso de terapia de combinación, los agentes pueden administrarse al paciente por separado, secuencialmente, simultáneamente, o formulados como una mezcla en la misma composición farmacéutica.

35 La administración de un agente de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención a un paciente con cáncer de próstata puede por lo tanto dar como resultado la unión de una proteína kaliceína, tal como antígeno específico de próstata (PSA; hK3, gen de kaliceína humana 3) y/o kaliceína glandular humana (hK2), presente en o sobre células cancerosas prostáticas y da como resultado la inhibición del crecimiento y/o muerte de células cancerosas prostáticas en el paciente. Por ejemplo, el agente puede reducir la velocidad de crecimiento, y/o presencia, de células cancerosas prostáticas en el paciente en al menos 10 %, en particular al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, y más particularmente en 100 % en comparación con la velocidad de crecimiento observada y/o presencia, de células cancerosas prostáticas en el paciente antes del tratamiento. Se conocen en la técnica métodos para medir la velocidad de crecimiento y/o presencia de células cancerosas prostáticas en un sujeto.

40 Por lo tanto la invención proporciona métodos para el tratamiento de cáncer de próstata.

45 Por "tratamiento" se incluye tratamiento tanto terapéutico como profiláctico del paciente. El término "profiláctico" se usa para abarcar el uso de un agente, o formulación del mismo, como se describe en el presente documento que previene o reduce la probabilidad de cáncer de próstata, o la propagación, diseminación o metástasis de cáncer de próstata localizado en un paciente o sujeto. El término "profiláctico" también abarca el uso de un agente, o formulación del mismo, como se describe en el presente documento para evitar la reaparición de cáncer de próstata en un paciente que se ha tratado previamente para el cáncer de próstata.

50 El cáncer de próstata para tratar por el primer aspecto de la presente invención puede localizarse en la próstata, o puede ser un cáncer de próstata no localizado (es decir, diseminado). El cáncer de próstata localizado en la próstata

puede, por ejemplo, clasificarse como cánceres T1 o T2 clínicos de acuerdo con el sistema TNM (abreviado de Tumor/Nódulos/Metástasis) mientras que el cáncer de próstata no localizado/diseminado puede clasificarse, por ejemplo, como cánceres clínicos T3 o T4.

5 El cáncer de próstata para tratar por el primer aspecto de la presente invención puede ser cáncer de próstata metastásico. La metástasis se refiere a la propagación de un cáncer desde su localización original a otros sitios en el cuerpo. Por ejemplo, el cáncer de próstata metastásico para tratar puede ser una metástasis presente en el sistema linfático; en el hueso (incluyendo columna vertebral, vértebras, pelvis, costillas); metástasis dentro de la pelvis, el recto, la vejiga o la uretra. Las metástasis presentes en otras localizaciones menos comunes también pueden
10 tratarse con la presente invención. Las metástasis pueden ser micrometástasis. La micrometástasis es una forma de metástasis en la que los tumores de nueva formación son generalmente demasiado pequeños para detectarse o se detectan con dificultad. Por ejemplo, la presente invención proporciona al experto en la materia medios para tratar células cancerosas individuales o grupos de células, incluso si no es posible diagnosticar la presencia de dichas células o grupos, pero existen, por ejemplo, como enfermedad diseminada oculta.

15 En consecuencia, se anticipa que una ventaja técnica particularmente importante del tratamiento proporcionado por la presente invención en comparación con los tratamientos de la técnica anterior de cáncer de próstata es la eficacia potenciada en el tratamiento de cáncer de próstata diseminado y/o metastásico (incluyendo micrometastásico).

20 Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona agentes y métodos para la prevención o el tratamiento de metástasis de un tumor de próstata primario.

El cáncer de próstata tiende a desarrollarse en hombres de más de 50 años de edad, más habitualmente en hombres de más de 60, 65 o 70 años y aunque es uno de los tipos más frecuentes de cáncer en los hombres,
25 muchos nunca tienen síntomas, no se someten a ninguna terapia y con el tiempo mueren por otras causas. Esto se debe a que el crecimiento del cáncer de próstata es, en la mayoría de los casos, lento, no presenta síntomas, y ya que los hombres con la afección son mayores, con frecuencia mueren de causas no relacionadas con el cáncer de próstata, tales como enfermedad cardíaca/circulatoria, neumonía, otros cánceres no relacionados o edad avanzada. Aproximadamente dos tercios de los casos de cáncer de próstata son de crecimiento lento, el otro tercio es más agresivo y de desarrollo rápido.

30 En consecuencia, el desarrollo de tratamientos eficaces de cáncer de próstata es particularmente importante para el tratamiento de las formas más agresivas y de desarrollo rápido del cáncer, particularmente en pacientes más jóvenes. En consecuencia, en una realización, el primer aspecto de la invención se refiere al tratamiento del cáncer de próstata en un paciente que tiene una edad menor de 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40 años, o menor, en el momento del diagnóstico de cáncer de próstata y/o en el momento del tratamiento.

40 Se cree que los hombres que tienen un pariente de primer grado (padre o hermano) con cáncer de próstata, tienen el doble de riesgo de desarrollar cáncer de próstata, y se cree que los que tienen dos parientes de primer grado afectados tienen un riesgo cinco veces mayor en comparación con los hombres sin historial familiar. En consecuencia, el primer aspecto de la invención puede relacionarse con el tratamiento de cáncer de próstata en un paciente que se caracteriza por que a uno, a dos o a más miembros de la familia, en particular miembros de la familia de primer grado (tales como el padre o un hermano), se les ha diagnosticado previamente cáncer de
45 próstata.

El primer aspecto de la invención también se refiere al tratamiento de cáncer de próstata en un paciente, en el que el cáncer de próstata para tratar es cáncer de próstata resistente a castración (CRPC). El CRPC puede caracterizarse por hacerse normalmente refractario al tratamiento hormonal después de uno a tres años, y reanudar el crecimiento a pesar de la terapia hormonal.

50 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente como se ha definido anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 También pueden incluirse compuestos adicionales en las composiciones farmacéuticas, incluyendo, agentes quelantes tales como EDTA, citrato, EGTA o glutatión.

60 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de una manera conocida en la técnica que es suficientemente estable en almacenamiento y adecuada para administración a seres humanos y animales. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden liofilizarse, por ejemplo, mediante criodesecación, secado por pulverización, enfriado por pulverización, o mediante el uso de formación de partículas a partir de formación de partículas supercríticas.

65 Por "farmacéutica aceptable" se entiende un material no tóxico que no reduce la eficacia de la actividad de unión a proteína kaliceína del agente de la invención. Dichos tampones, vehículos o excipientes farmacéuticamente

aceptables se conocen bien en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia).

5 Se entiende que el término "tampón" significa una solución acuosa que contiene una mezcla de ácido-base con el fin de estabilizar el pH. Son ejemplos de tampones Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazoléctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

10 Se entiende que el término "diluyente" significa una solución acuosa o no acuosa con el fin de diluir el agente en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

15 Se entiende que el término "adyuvante" significa cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del agente de la invención. El adyuvante puede ser uno o más de cinc, cobre o sales de plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitación, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferente composición de acilo. El adyuvante también puede ser polímeros catiónicos tales como éteres de celulosa catiónicos, ésteres de celulosa catiónicos, ácido hialurónico desacetilado, quitosano, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos tales como poli(vinil imidazol), y polipéptidos catiónicos tales como polihistidina, polilisina, poliarginina y péptidos que contienen estos aminoácidos.

25 El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Los ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Son ejemplos de polímeros almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carrageninas, ácido hialurónico y derivados de los mismos, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, por ejemplo, para control de la viscosidad, para conseguir bioadhesión o para proteger el lípido de degradación química y proteolítica. Son ejemplos de lípidos ácidos grasos, fosfolípidos, mono, di y triglicéridos, cerámidos, esfingolípidos y glicolípidos, todos de diferente longitud de cadena de acilo y saturación, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina de huevo y soja hidrogenada, que se añaden a la composición por razones similares a las de polímeros. Son ejemplos de minerales talco, óxido de magnesio, óxido de cinc y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como reducción de la acumulación de líquido o propiedades de pigmentos ventajosas.

40 Los agentes de la invención pueden formularse en cualquier tipo de composición farmacéutica que se sabe en la técnica que es adecuada para el suministro de los mismos.

45 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de un liposoma, en el que el agente se combina, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos, tales como lípidos, que existen en formas agregadas como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Los lípidos adecuados también incluyen los lípidos anteriormente modificados mediante poli(etilenglicol) en el grupo de cabeza polar para prolongar el tiempo en circulación en el torrente sanguíneo. La preparación de dichas formulaciones liposómicas puede encontrarse por ejemplo en el documento US 4.235.871, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de microsferas biodegradables. Se han usado ampliamente poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(caprolactona) (PCL) y polianhídridos como polímeros biodegradables en la producción de microsferas. Pueden encontrarse preparaciones de dichas microsferas en el documento US 5.851.451 y en el documento EP 0 213 303, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia.

60 En una realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma de geles poliméricos, donde se usan polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carrageninas, ácido hialurónico y derivados de los mismos, ácido poliacrílico, polivinil imidazol, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis y polivinilpirrolidona se usan para espesar la solución que contiene el agente. Los polímeros también pueden comprender gelatina o colágeno.

65

Como alternativa, los agentes pueden simplemente disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo), goma de tragacanto y/o diversos tampones.

5 Se apreciará que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir iones y un pH definido para potenciación de la acción del agente activo. Adicionalmente, las composiciones pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc.

10 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la materia. Por lo tanto, las vías posibles de administración incluyen parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral y rectal. Además es posible la administración a partir de implantes. La infusión puede ser una vía deseada debido a la citotoxicidad potencialmente alta del agente administrado.

15 En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intracerebroventricular, por vía intraarticular, por vía intra-arterial, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o pueden administrarse por técnicas de infusión. Se usan convenientemente en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer a la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deberían tamponarse adecuadamente (por ejemplo, hasta un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

20 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados y pueden almacenarse en una condición criodesecada (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

25 Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, intravenosa.

30 Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación (por ejemplo, en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión del polipéptido activo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propulsor como el disolvente, que pueden contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, sorbitán trioleato. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador para contener una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

35 Las composiciones farmacéuticas se administrarán a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" o "terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y un régimen de administración dados. Esta es una cantidad predeterminada de material activo que se ha calculado que produce un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo o diluyente requerido, es decir, un transportador o vehículo de administración. Además, se pretende que signifique una cantidad suficiente para reducir y/o prevenir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del hospedador. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en una condición clínicamente significativa en un hospedador. Como se aprecia por los expertos en la materia, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa que se ha calculado que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y uso para fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse por el trabajador médico experto habitual basándose en características del paciente, tal como edad, peso, sexo, condición, complicaciones, otras enfermedades, etc., como se conoce bien en la técnica. La administración de la dosis farmacéuticamente eficaz puede llevarse a cabo tanto mediante administración individual en forma de una unidad de dosis individual o varias unidades de dosis más pequeñas como mediante

administraciones múltiples de dosis subdividas a intervalos descritos. Como alternativa, la dosis puede proporcionarse como una infusión continua durante un periodo prolongado.

5 El agente definido anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención puede formularse a diversas concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad del compuesto que se use. La formulación puede comprender el agente activo a una concentración de entre 0,1 μM y 1 mM, entre 1 μM y 500 μM , entre 500 μM y 1 mM, entre 300 μM y 700 μM , entre 1 μM y 100 μM , entre 100 μM y 200 μM , entre 200 μM y 300 μM , entre 300 μM y 400 μM , entre 400 μM y 500 μM y aproximadamente 500 μM .

10 Se apreciará por los expertos en la materia que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse solas o en combinación con otros agentes terapéuticos usados en el tratamiento de un cáncer de próstata, o antes, después o al mismo tiempo que el tratamiento del paciente con otras modalidades terapéuticas para el tratamiento de cáncer de próstata, tales como cirugía (por ejemplo, prostatectomía radical), radioterapia, braquiterapia, terapia de radiación de haz externo, ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, 15 fármacos quimioterapéuticos orales, criocirugía (congelación del tumor), terapia hormonal (tal como terapia de antiandrógenos), castración o combinaciones de las anteriores.

20 La presente invención también proporciona un kit que comprende un agente como se ha definido anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente.

La presente invención también proporciona un agente para uso en medicina sustancialmente como se describe en el presente documento.

25 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica sustancialmente como se describe en el presente documento.

30 La presente invención también proporciona el uso de un agente sustancialmente como se describe en el presente documento.

La presente invención también proporciona un método de tratamiento sustancialmente como se describe en el presente documento.

35 La presente invención también proporciona un kit sustancialmente como se define en el presente documento.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método terapéutico, tratando dicho método cáncer de próstata primario y diseminado, con un agente como se ha definido anteriormente.

40 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de terapia, pudiendo usarse dicho método para tratar metástasis, tal como metástasis de ganglios linfáticos y/o metástasis de hueso, incluyendo micrometástasis.

45 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un método terapéutico, pudiéndose usarse dicho método junto con o después de radioterapia externa, tratamientos citostáticos y de andrógenos u otros tratamientos no acoplados a los anticuerpos/fragmentos terapéuticos de dirección a tumores.

50 De acuerdo con aspectos específicos de la invención, se proporcionan anticuerpos marcados para terapia, que son específicos para PSA y/o hK2, usándose dichos anticuerpos marcados para tratar el cáncer de próstata, es decir, tejido productor de PSA y/o hK2.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan usos de dichos métodos.

55 El método de terapia de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja sobre la técnica anterior de que permite la terapia de cáncer de próstata, y dicho método de terapia puede también usarse para tratar metástasis, incluyendo micrometástasis, tales como metástasis de ganglios linfáticos, o cualquiera de las otras formas de metástasis como se ha descrito anteriormente, y usarse junto con o después de procedimiento posoperatorio y durante o después de tratamientos de radiación, citostáticos y de andrógenos.

60 La descripción anterior se centra en realizaciones de la presente invención aplicables a un método terapéutico de cáncer prostático. Sin embargo, se apreciará que la invención no se limita a esta aplicación sino que puede aplicarse a muchas otras combinaciones de terapia incluyendo por ejemplo metástasis, exámenes posoperatorios y exámenes durante o después de la radiación, tratamientos citostáticos y de andrógenos. Con respecto a terapia de metástasis las metástasis se tratarán en ganglios linfáticos.

65 En otra realización puede usarse Cirugía RadioDirigida (RGS) o Cirugía Dirigida por Imágenes (IGS) para identificar restos de unión específicos anti-kalcreína marcados con indicador como se ha descrito anteriormente (tales como

anticuerpos de PSA y/o hK2) durante y/o después de la cirugía. Por lo tanto, un agente que comprende un resto de unión y un resto detectable como se ha analizado anteriormente puede administrarse durante y/o después de la cirugía. En esta realización el agente, tal como un anticuerpo anti-PSA y/o anti-hK2 marcado con indicador, puede en primer lugar infundirse. A continuación, puede usarse RGS/IGS para identificar tejido productor de PSA/hK2 con un instrumento de detección sensible al resto detectable, durante o antes de la cirugía. El resto detectable puede, por ejemplo, ser un resto detectable magnéticamente sensible o emisor de radiación; puede ser, por ejemplo, un emisor de radiación de Cerenkov y/o Bremsstrahlung; puede ser un marcador fluorescente y/o un marcador magnético o magnetizable. En consecuencia, el RGS/IGS de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, un método que se basa en la detección de radiación óptica, de Cerenkov, Bremsstrahlung o beta; la detección de un marcador radionúclido, y/o puede implicar magnetometría. RGS se conoce bien por los expertos en la técnica como una técnica quirúrgica que permite al cirujano identificar tejido "marcado" por el resto detectable.

Las visualizaciones obtenidas de acuerdo con lo anterior pueden combinarse con otros métodos de visualización radiológica, tales como SPECT/PET, tomografía computarizada (CT), ultrasonido (US), y tomografía de resonancia magnética (TRM).

En consecuencia, en un segundo aspecto, la presente invención también proporciona un agente que comprende o consiste en un resto de unión con especificidad por una proteína kaliceína (tal como se ha descrito anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención) y un resto detectable como se ha analizado anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención para uso en medicina mediante administración a un paciente con cáncer de próstata antes o durante la cirugía, tal como Cirugía RadioDirigida o Dirigida por Imágenes.

Por lo tanto, el segundo aspecto también posibilita el uso de un agente que comprende o consiste en un resto de unión con especificidad por una proteína kaliceína y un resto detectable en la fabricación de un medicamento para administración a un paciente con cáncer de próstata antes de o durante la cirugía, tal como Cirugía RadioDirigida o Dirigida por Imágenes.

El segundo aspecto de la presente invención también proporciona un método de cirugía, tal como Cirugía RadioDirigida o Dirigida por Imágenes, que se realiza en un paciente con cáncer de próstata, comprendiendo el método la etapa de administrar una cantidad eficaz de un agente que comprende o consiste un resto de unión con especificidad por una proteína kaliceína y un resto detectable al paciente antes o durante la cirugía.

Se contempla que cualquier método, agente o composición descrito en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro método, agente o composición descrito en el presente documento.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Estas y otras realizaciones de la invención se apreciarán y entenderán mejor cuando se consideren junto con la descripción anterior y los dibujos adjuntos. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción anterior, aunque indica diversas realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de la misma, se proporciona como ilustración y no como limitación. Muchas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o reordenaciones pueden realizarse dentro del alcance de la invención sin alejarse del espíritu de la misma, y la invención incluye todas estas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o reordenaciones.

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

La **Fig. 1** muestra la cinética de anticuerpo PSA30 marcado con ^{125}I en diversos tejidos después de la administración intravenosa en ratones normales.

La **Fig. 2** muestra la cinética de anticuerpo PSA30 marcado con ^{125}I en diversos tejidos después de la administración intravenosa en ratones a los que se ha implantado un xenoinjerto de células tumorales prostáticas metastásicas, y esto muestra que las células tumorales prostáticas metastásicas muestran una fuerte captación del anticuerpo PSA30.

La **Fig. 3** muestra relaciones de tumor con respecto a órganos de ^{125}I -PSA30 después de inyección intravenosa en ratones desnudos que portan tumores subcutáneos basados en LNCaP en diversos momentos después de la inyección (n=34). Los mayores valores de relación indican una mayor especificidad de captación en tumor que en el tejido identificado.

Las **Figs. 4A-H** muestran los resultados de autorradiografía digital: captación normalizada individualmente de ^{125}I -PSA30 (Fig. 4A) y 18F-colina (Fig. 4B), 48 h después de la inyección de ^{125}I -PSA30 más 1 h después de la

- inyección de colina marcada, en la misma sección tumoral separada por isótopos. Se verificó el análisis histológico mediante HyE (Fig. 4C, Figs. 4E-F) y expresión de PSA usando anticuerpo de PSA 2E9 total (Fig. 4D, Figs. 4G-H) usando secciones adyacentes. No hay asociación directa entre áreas de alta captación de mAb PSA30 y alta captación de colina. Nota: se permitió a este ratón movimiento libre después de la inyección de 18F-colina. 209x297mm (300 x 300 DPI).
- 5 La **Fig. 5** muestra la cinética de anticuerpo 5A10 marcado con ¹²⁵I en diversos tejidos después de administración intravenosa en ratones normales.
- 10 La **Fig. 6** muestra la cinética de anticuerpo 11 B6 marcado con ¹²⁵I en diversos tejidos después de administración intravenosa en ratones normales.
- 15 La **Fig. 7** muestra la cinética de anticuerpo 11 B6 marcado con ¹²⁵I en diversos tejidos después de administración intravenosa en ratones a los que se les ha implantado xenoinjerto de células tumorales prostáticas metastásicas. La captación en órgano se expresa como % de AI/g a lo largo del tiempo.
- 20 La **Fig. 8** muestra la biodistribución de ¹¹¹In-11B6 en xenoinjertos de LnCAP. La acumulación de radiactividad alcanzó un máximo después de 48 h pi con 16,4 ± 1,92 % de AI/g (porcentaje de actividad inyectada por gramo). La captación en órganos normales (hígado, bazo, riñones, hueso, próstata, testículos) está a un nivel menor. Se observó una captación algo elevada en las glándulas salivares, probablemente debido a una cierta expresión normal de la expresión de hK2.
- 25 La **Fig. 9** muestra ejemplos de algunos radionúclidos terapéuticos.
- 30 La **Fig. 10** muestra una ilustración del principio de PAT. En presencia de radiación externa de baja dosis, un agente que se dirige a tumores de alta Z produce una potenciación de la dosis absorbida local grande en células tumorales diana.
- 35 La **Fig. 11** muestra un ejemplo de cómo pueden usarse nanopartículas para captura de imágenes de multimodalidad y terapia mediante unión a agentes de dirección a tumores como anticuerpos.
- 40 La **Fig. 12** muestra las relaciones de tumor/sangre. La relación aumenta a lo largo del tiempo, lo que indica una dirección activa de hK2 con ¹¹¹In-11B6 en tumores LnCAP.
- 45 La **Fig. 13** muestra la biodistribución comparativa de ¹¹¹In-11B6 en xenoinjertos que expresan hK2 (LnCAP) y xenoinjertos negativos para hK2 (DU145) a 48 h pi. Los resultados mostraron una diferencia estadística significativa (p < 0,005) entre los dos xenoinjertos en la acumulación tumoral, mientras que la acumulación de radiactividad en la mayoría de órganos normales permaneció en el mismo nivel. LnCAP tuvo una captación tumoral más de 3 veces mayor que el DU145. Esto indica que el ¹¹¹In-11B6 es específico de hK2.
- 50 La **Fig. 14** muestra la secuencia de aminoácidos y estructura epitópica de PSA, de acuerdo con Leinonen, J. *et al.* Clin Chem 2002; 48: 2208-2216.
- 55 La **Fig. 15** muestra una representación de Scatchard de un 5A10-Fab a modo de ejemplo.
- 60 La **Fig. 16** muestra la cinética de marcaje de ¹⁷⁷Lu-11B6.
- 65 La **Fig. 17** muestra la estabilidad *in vitro* de ¹⁷⁷Lu-11B6 en PBS y EDTA.
- La **Fig. 18** muestra imágenes de SPECT representativas de ¹⁷⁷Lu-11B6 en xenoinjertos de LnCAP.
- La **Fig. 19** muestra la biodistribución de ¹⁷⁷Lu-11B6 en xenoinjertos de LnCAP.
- La **Fig. 20** muestra la biodistribución detallada a las 72 h pi de ¹⁷⁷Lu-11B6 en xenoinjertos de LnCAP.
- La **Fig. 21** muestra la biocinética *in vivo* de ¹⁷⁷Lu-11B6 en xenoinjertos de LnCAP.
- La **Fig. 22** muestra fotografías representativas del tamaño tumoral antes (imagen izquierda) y después (imagen derecha) del tratamiento con ¹⁷⁷Lu-11B6.
- La **Fig. 23** muestra un resumen del efecto de (a) dosis individual de ¹⁷⁷Lu-11B6, (b) dosis doble de ¹⁷⁷Lu-11B6 y (c) tratamiento de control en el tamaño tumoral en xenoinjertos de LnCAP.
- La **Fig. 24** muestra (a) datos de crecimiento tumoral y (b) una imagen de SPECT para un ratón con xenoinjertos de LnCAP tratado con una única dosis de ¹⁷⁷Lu-11B6.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones particulares de la invención. Debería apreciarse por los expertos en la materia que las técnicas desveladas en los ejemplos a continuación representan técnicas que el inventor ha descubierto que actúan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto puede considerarse que constituyen modos específicos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y obtener aún un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1 – Biodistribución de ¹²⁵I-PSA30 y ¹²⁵I-11B6

Material y Método: Los anticuerpos PSA30 y 11B6 se marcaron con ¹²⁵I (PerkinElmer, Estados Unidos), usando el método de Iodogen. Brevemente, se usó un tubo de ensayo recubierto con 150 µg de 1,3,4,6-tetracloro-3α,6α-difenil glicolurilo para marcaje de 200 µg de PSA30. Después de haberse incubado la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente, se retiraron los componentes de bajo peso molecular mediante filtración en gel (columna de PD-10, GE Healthcare, Reino Unido). La pureza radioquímica fue del 95 % después de filtración en gel.

Resultados y análisis. Véase Figs. 2 y 3. Los tumores LNCaP tuvieron mayor captación en comparación con otros órganos investigados en la mayoría de puntos temporales y alcanzaron un máximo (4,32 % de AI/g) a las 24 h después de inyección intravenosa de formulaciones de ¹²⁵I-PSA30. A diferencia de todos los otros órganos que mostraban una reducción de la actividad, los tumores LNCaP mostraron un aumento notable de la actividad (en 32 %) durante las primeras 24 horas después de inyección. En comparación con ratones no portadores de tumores, la acumulación tiroidea aumentó en gran medida. La captación de mAb ¹²⁵I-PSA30 en tumores LNCaP alcanza un máximo a las 24 h después de la inyección, con una reducción brusca posterior en la captación tumoral observada a las 72 h después de la inyección. Resulta importante, en este mismo punto temporal, que hay un aumento brusco en la captación tiroidea. Esta correlación inversa es un indicador probable de que se ha producido un efecto de deshalogenación. En conclusión, ¹²⁵I-PSA30 puede dirigirse eficazmente a fPSA en ratones con xenoinjerto basado en LNCaP.

Ejemplo 2 – Biodistribución de ¹¹¹In-DTPA-11B6

Material y Método: Los experimentos animales se realizaron de acuerdo con la legislación nacional sobre la protección de animales de laboratorio. El estudio animal se ha aprobado por el Comité de Ética local para Investigación Animal. Se usaron ratones desnudos inmunodeficientes macho (6-8 semanas de vida) obtenidos de Taconic Europe (Bomholt, Dinamarca) para este estudio. Se implantaron xenoinjertos de células de carcinoma de próstata LNCaP que expresaban hK2 por vía subcutánea en el flanco derecho. Para xenoinjerto, células LNCaP, 5,2 x 10⁶ células/ratón en 100 µl de medio celular y 100 µl de Matrigel (BD Sciences, Bedford, Estados Unidos). Se implantaron células DU145 (una línea celular negativa para hK2), 1-2 x 10⁶, sc en el flanco derecho para actuar como un control negativo. Tres-seis semanas después de la inyección de células LNCaP, se inyectó en 5 grupos de ratones (4-5 animales/grupo) que portaban xenoinjertos LNCaP y 1 grupo (3 animales/grupo) que portaba xenoinjertos DU145 cada uno iv. 100 µl de ¹¹¹In-DTPA-11B6 (~200 kBq en 100 µl y 22,5 µg de proteína). Los animales se sacrificaron en un punto temporal diferente, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h o 168 h p.i. y el grupo de control a las 48 h p.i. Se colocaron órganos de interés (véase tabla) en viales de 20 ml para recuento de centelleo (Zinsser Analytic, Frankfurt, Alemania), se pesaron y se midieron en un contador gamma automático con un detector de NaI(Tl) de 7,62 cm (1480 Wizard, OY, Wallac, Turku, Finlandia). Todos los órganos se midieron dos veces después de la disección y después del último punto temporal. Se realizó medición de la radiactividad como un protocolo convencional posterior.

Medición de la radiactividad: Se usó un protocolo convencional para medición de un radionúclido. Se usaron cuentas por minuto corregidas con respecto a nivel de fondo para la evaluación. El valor de captación tisular, expresado como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g), se calculó como:

$$\% \text{ de DI/g} = (\text{radiactividad tisular/radiactividad inyectada})/\text{peso del órgano} \times 100$$

en la que para inyecciones iv:

$$\text{Radiactividad inyectada} = \text{Radiactividad promedio en jeringas de control} - \text{radiactividad en jeringa usada} - \text{radiactividad en cola}$$

Resultados y análisis: Véase Figs. 8, 12 y 13. Los resultados preliminares mostraron que ¹¹¹In-11 B6 se acumuló eficazmente en el tumor a lo largo del tiempo, alcanzando un máximo a las 48 h pi con 16,4 ± 1,92 % de AI/g (porcentaje de actividad inyectada por gramo). La captación de radiactividad en órganos normales (hígado, bazo, riñones, hueso, próstata, testículos) está a un nivel menor. Se observó una captación algo elevada en las glándulas salivares, probablemente debido a una cierta expresión normal de hK2 (Fig. 8). Esto se investigará adicionalmente en estudios futuros. Además, el ¹¹¹In-DTPA-11B6 fue específico de hK2 ya que tuvo captación significativamente menor en los xenoinjertos de control negativo DU145 (Fig. 13). La relación de tumor/sangre aumentó a lo largo del tiempo, lo que indicaba que se captaba cada vez más de ¹¹¹In-DTPA-11B6 en el tumor (Fig. 12). En conclusión, los

datos de biodistribución de ^{111}In -11B6 muestran propiedades de dirección a tumores prometedoras en cáncer de próstata, lo que indica potencial para terapia de carcinoma de próstata usando otros radionúclidos.

Ejemplo 3 – Obtención de imágenes por autorradiografía digital

5 *Materiales y métodos:* Se realizó DAR en animales a los que se inyectó ^{125}I -PSA y ^{18}F -colina. Los animales se sacrificaron una hora después de la inyección de sondas metabólicas y se retiraron inmediatamente los tumores, se fijaron en Cryomount (HistoLab products AB, Suecia), se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se cortaron en secciones de 100 μm para DAR o secciones de 20 μm para análisis de histopatología e inmunohistoquímica (IHC). Se usó un sistema basado en detector de tira de silicio (Biomlex 700 Imager; Bimolex AS, Oslo) para obtener o capturar imágenes de la distribución de radiactividad dentro de las secciones más gruesas. Se usaron las diferencias tanto en los espectros de emisión como en la velocidad de degradación para producir imágenes separadas de cada radionúclido en animales a los que se inyectó más de un radionúclido, en este caso, ^{125}I y ^{18}F .

15 *Resultados y análisis:* Véase resultados en las Figs. 4A-H. Basándose en estos datos, se demostró que la captación de mAb PSA30 en tumores escindidos alcanzó el máximo a las 24 horas después de inyección intravenosa, y se conserva en tumor en comparación con tejidos normales. Las relaciones de T/O relativamente bajas (véase Tabla en la Fig. 3) pueden atribuirse a factores tales como: una barrera del sitio de unión, vista cuando una dosis baja de anticuerpos se satura por los antígenos fPSA en el espacio perivasculoso evitando de este modo penetración más profunda en el tumor sólido; permeabilidad vascular insuficiente dentro del tumor; o desyodación del anticuerpo (como se sugiere por la alta acumulación de yodo en el tiroides). Dos modos de mejorar las relaciones de T/O serían aumentar la dosis de anticuerpo y ensayar diferentes radiomarcadores. A pesar de esta desventaja, se descubrió una acumulación de actividad de ^{125}I -PSA30 en tejido tumoral.

25 *Inmunohistoquímica e histopatología (véase resultados en las Figs. 4A-H).* Para estudiar PSA, se examinaron criosecciones tumorales de 20 μm (congeladas y fijadas como se ha descrito anteriormente) usando IHC. La inmunorreactividad contra PSA o hK2 se visualizó mediante el uso del kit de sistema DAKO EnVision Flex/HRP (Dako Corporation). También se tiñeron secciones tumorales adyacentes con hematoxilina (tinción de núcleos) y eosina (tinción citoplasmática) (HyE) y la morfología general se analizó bajo un microscopio de transiluminación convencional. Con tinción de HyE, se tiñeron regiones viables de las secciones tumorales y áreas necróticas. Como control positivo, se incubaron secciones tumorales de LNCaP con mAb de PSA 2E9 a una dilución de 1:1000 y se visualizó como se ha descrito anteriormente. Como control negativo, se visualizó una sección tumoral de un ratón que recibió una inyección intravenosa de PSA30 sin incubación de un anticuerpo secundario, pero incluyendo todas las otras etapas de IHC. Las secciones tisulares se exploraron usando un explorador de microscopio Carl Zeiss MIRAX Scan y se visualizó con el software MIRAX Viewer (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Alemania).

Ejemplo 4 – Radiomarcaje

40 *Yodación directa ($^{125}\text{I}/^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$):* Se mezclaron proteínas (10 μl , 1 mg/ml en PBS) con ^{125}I como solución de NaI (4 MBq) usando el método Cloramina-T (CAT, Sigma St. Louis, MO, Estados Unidos). La reacción se inició añadiendo CAT en PBS (10 μl , 2 mg/ml) y se incubó durante 1 min con agitación vigorosa y después se terminó añadiendo metabisulfito sódico (20 μl , 2 mg/ml). Las proteínas marcadas se separaron de componentes de reacción de bajo peso molecular y ^{125}I que no reaccionaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna NAP-5 (Sephadex G-25, GE Healthcare) pre-equilibrada con PBS.

45 *Yodación indirecta ($^{125}\text{I}/^{124}\text{I}/^{131}\text{I}/^{211}\text{At}$):* Se preparó precursor de marcaje, N-succinimidil p-(trimetilestanil)benzoato (SP-MB), de acuerdo con Orlova *et al* en Nucl Med Biol 27:827-835 (2000), y se añadieron 5 μg de SPMB a 5 MBq o ^{125}I o ^{211}At en una solución al 5 % de ácido acético. Para iniciar la reacción, se añadieron 40 μg de cloramina-T (Sigma, St. Louis, Mo.) en solución acuosa. La mezcla de reacción se agitó durante 5 min y se añadieron 80 μg de meta-bisulfito sódico (Aldrich, Steinheim, Alemania) en solución acuosa para detener la reacción. El precursor radiomarcado se añadió a 40 μg de solución de proteína en tampón de borato 0,07 M, pH 9,2. La reacción de acoplamiento se realizó a temperatura ambiente durante 45 min con agitación continua. Se separaron variantes proteicas marcadas de productos de bajo peso molecular usando una columna de exclusión por tamaño NAPTM-5 (GE, Healthcare) equilibrada con PBS. Las variantes de proteína radiomarcada se analizaron después mediante un ensayo de IRMA (de acuerdo con Evans *et al*, presentada a CBR) para verificar que el procedimiento de marcaje no había afectado a la afinidad de unión hacia su diana.

60 *Radiomarcado con ^{177}Lu :* Se realizó conjugación de isotiocianato-benzil-CHX-Aⁿ-DTPA (130 nM) con proteína (60 nM) en 220 μl de tampón de borato 0,7 M a pH 9,2 durante una noche en un baño de agua a 37 °C. La proteína-CHX conjugada se purificó en una columna de exclusión por tamaño NAP-5 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), usando tampón de acetato sódico 0,2 M pH 5,5 como eluyente, y después se dividió en diez lotes que después se usaron para quelación. El tiempo de quelación se optimizó tomando muestras de un proceso de quelación continuo y comprobando la pureza del quelado en placas de cromatografía de capa fina instantánea (ITLC) SG (Biodex) con tampón de ejecución de citrato 0,2 M. Las placas se analizaron en un Phosphorimager Cyclone (Perkin Elmer, Wellesley, MA, Estados Unidos). Se descubrió que la quelación estaba completa después de 30 min a temperatura

ambiente. La cantidad de lutecio radiactivo se varió dependiendo de las necesidades de experimentos individuales.

Para ensayar con respecto a la presencia de ^{177}Lu débilmente quelado, se realizaron exposiciones a EDTA. Se expusieron muestras por triplicado del producto quelado con un exceso molar 200:1 o 1.000:1 de EDTA frente al quelante en una incubación durante una noche a 37 °C. La concentración de EDTA se calculó suponiendo que la conjugación era cuantitativa, produciendo de este modo un valor medio de dos moléculas de CHX-A-DTPA por anticuerpo. Después se analizaron muestras de las soluciones mediante ITLC como anteriormente. Como control, también se mantuvieron muestras por triplicado de [^{177}Lu]-proteína en PBS a 37 °C o 4 °C durante una noche.

10 **Ejemplo 5 – Estabilidad in vivo**

Para analizar la estabilidad *in vivo* de los conjugados radiomarcados, se inyectan a ratones normales i.v. radiomarcadores y se sacrifican después de diferentes puntos temporales. Después se recoge la sangre y se centrifuga a 5.000 g. Las muestras de sangre se separan después en columnas de NAP-5 (punto de corte, 5 kDa) equilibradas con PBS, y se determina la cantidad relativa de radiactividad presente en la fracción de alto peso molecular.

15 **Ejemplo 6 – Supervivencia celular para supervisión de efectos terapéuticos**

20 Las células se siembran en placas de Petri (diámetro de 6 cm, aproximadamente 2×10^5 células/placa). Después de 48 h, se añaden proteínas radiomarcadas (57 ng/placa o 287 ng/placa, correspondientes a aproximadamente 1:1 y 5:1 anticuerpos por antígeno) a las células. Para determinar el efecto de $^{125/131}\text{I}/^{177}\text{Lu}$ en el medio, algunas de las placas se preincuban con una cantidad en exceso de proteína no marcada (29 μg /placa). Se usan placas extra para la estimación del número de degradaciones por célula (DPC). En estas placas, la captación celular de proteína radiomarcada se mide en seis puntos temporales durante la incubación de 24 horas. Las células se lavan después seis veces con medio sin suero frío, y la incubación se continúa en medio de cultivo nuevo. Las células se recuentan aproximadamente una vez a la semana, y se vuelven a sembrar cada 2 semanas. Las DPC se estiman calculando el área bajo la curva de captación para las dos concentraciones de anticuerpo, así como para las placas bloqueadas. Para la concentración de proteínas radiomarcadas menor, las células reciben aproximadamente 56 DPC, y para la mayor aproximadamente 150 DPC, mientras que las células bloqueadas reciben aproximadamente 2 DPC. Los resultados obtenidos se analizan mediante regresión no lineal (crecimiento exponencial), usando 1/2 como el factor de ponderación.

35 **Ejemplo 7 – Estudios in vivo**

Se usan los siguientes modelos de xenoinjerto: modelos tumorales LnCAP, DU145, PC-3. PSA se expresa en las tres líneas celulares mientras que hK2 se expresa en LnCAP y no se expresa en DU145 o PC-3.

Para xenoinjertos, se resuspendieron células LNCaP, DU145 o PC-3 (2-10 millones de células) recogidas en tripsina 0,02 %/PBS, en el medio y se inyectaron sc en el flanco derecho con 200 μl de suspensión celular que contenía una cantidad igual de Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA). Se supervisó la formación tumoral visualmente o mediante palpación.

45 *Experimento de bloqueo:* El experimento de bloqueo en Experimento de Biodistribución I se realizó para establecer si la captación de proteínas radiomarcadas en tumores era específica de hK2 o no. Antes de la inyección iv principal de proteína radiomarcada, se inyectó iv 0,8 – 3,0 mg de proteína no marcada en el grupo de ratón bloqueado. Se comparó la captación de radiactividad a las 24-72 h después de la inyección entre los grupos no bloqueados y bloqueados.

50 *Optimización de la actividad específica:* Este experimento se realiza para determinar la influencia de actividad específica (es decir, la dosis de proteína inyectada del conjugado radiomarcado) en la captación tumoral. Se prepara una serie de proteínas marcadas con ^{177}Lu con diversas actividades específicas predeterminadas. Se diluye una alícuota de proteína marcada con ^{177}Lu con una solución de reserva de proteína no marcada para proporcionar dosis de inyección que varían de 10 μg a 500 μg por ratón portador de LnCAP. Dos-tres días después de la inyección, los animales se sacrifican. Se escinden los órganos y tumores y se miden con respecto a la captación de radiactividad. La actividad específica que proporciona la captación tumoral más óptima se considera adicionalmente para dosimetría.

60 *Ejemplo de determinación de dosimetría:* Se inyecta en ratones portadores de LnCAP (4 ratones/grupos) proteína marcada con ^{177}Lu . Los animales se sacrifican 4 h pi – 2 semanas después de las inyecciones. La dosis absorbida en diferentes órganos se calcula usando esquema de MIRD. Se obtendrán curvas de tiempo-actividad para todos los tejidos y órganos de interés en el cuerpo (animal). Los estudios se basarán en la captura de imágenes cuantitativas de SPECT y/o PET. La integración de las curvas proporcionará actividad acumulada. Usando el formalismo de MIRD basado en propios calculados (basados en geometría específica y técnicas de Monte Carlo para fracciones absorbidas) se usarán valores S para convertir la actividad acumulada en dosis absorbida. En muchos casos la dosis cruzada tiene que calcularse cuidadosamente lo que significa que se realizarán cálculos de dosimetría

basados en Monte Carlo (Hindorf, *et al.* (2004) *J. Nuc. Med.*, 45: 1960-1965; Larsson, *et al.* (2007) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 22: 438-442; Larsson, *et al.* (2011) *Acta Oncol.*, 50: 973-980).

Ejemplo de captura de imágenes por SPECT y PET: La captura de imágenes por PET-CT y SPECT-CT es una parte integral de la terapia de radionúclidos. Proporciona una idea del grado en el que el material radiactivo se acumula en los tejidos y ayuda a proporcionar una estimación de la dosis terapéutica requerida y sus efectos. Para buenos resultados de tratamiento, debe suministrarse una dosis suficiente de radiación al tumor. Esto se confirma por captura de imágenes, como se analiza en las referencias mencionadas anteriormente con respecto a planificación de dosis, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

Radiobiología: Los métodos de dosimetría específicos basados en geometrías de animal de laboratorio/paciente individual se usarán para una dosimetría apropiada y pueden relacionarse con efectos biológicos y proporcionan la posibilidad de correlación con efectos radiobiológicos y para terapia optimizada de pacientes individuales.

Ejemplo 8 – Determinación de afinidad de unión

Método de Scatchard

Se determinó la afinidad de unión (Kd) de las variantes de anticuerpos producidas usando un método de Scatchard de acuerdo con Scatchard, *Ann N Y Acad Sci* 51: 660-72 (1949).

Brevemente, se usó una concentración fija de anticuerpo (o, en este caso, un fragmento de anticuerpo Fab) y diversas concentraciones de indicadores de PSA marcados con Eu³⁺.

Resonancia de plasmón superficial

La cinética de unión y afinidad de las variantes de anticuerpo también pueden determinarse mediante análisis de interacción bioespecífica en tiempo real en un instrumento Biacore. Brevemente, PSA o hK2 se inmoviliza en una microplaca sensora CM5 mediante acoplamiento de amina y los niveles de inmovilización alcanzaron 1000-2000 unidades de respuesta. Los derivados de anticuerpo anti-PSA o anti-hK2 diferentes (tanto mAb como Fab) se diluyen en concentraciones que varían de 0,1-10 nM en tampón de HBS-EP. La cinética de unión se estudia en una fase de asociación de 5 min y una fase de disociación de 30 min con un caudal de 50 µl/min, seguido de regeneración. Se calculan las constantes cinéticas usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 con corrección para transferencia de masa.

Ejemplo 9 – Ensayos inmunoradiométricos (IRMA)

Se realizaron ensayos inmunoradiométricos basados en anticuerpos monoclonales (IRMA) con respecto a calidad de unión de mAb o Fab radiomarcados por triplicado como un ensayo de tipo sándwich de cuatro etapas con etapas de lavado entre incubaciones (tampón de lavado: Tris-HCL 10 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05 %). El ensayo se construyó y optimizó de acuerdo con recomendaciones establecidas. Las placas de microtitulación de separación se recubrieron con H117 (0,2 µg/pocillo), un anticuerpo monoclonal que reconoce PSA o kaliceína 2 humana (hK2) libre o total con la misma afinidad, 30 diluido en tampón de recubrimiento (carbonato sódico 75 mM pH 9,6) y se incubó durante una noche a 4 °C. Los pocillos se incubaron después con tampón de detención 0,2 µg/pocillo (gelatina de pescado 3 % en tampón de lavado) durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se recubrieron con 200 µl de plasma (femenino) que contenía fPSA 3 ng/µl y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Después se mezclaron PSA30 radiomarcados y no marcados entre sí en tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM, BSA 0,25 % y Tween 20 0,05 %) a concentraciones descendentes y se añadió a los pocillos (volumen total: 50 µl/pocillo). El porcentaje de anticuerpo marcado por pocillo fue el siguiente: 100, 92, 84, 68, 50, 30 y 0 por ciento. Las placas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente, se lavaron y se midieron en un contador de pocillo NaI(Tl) (1282 Compugamma CS; LKB Wallac, Turku, Finlandia). Se aceptó para aplicación adicional una diferencia en la capacidad de detección de <25 % en relación con la desviación teórica. Las estimaciones de calidad de detección después de marcaje mostraron que el anticuerpo radiomarcado mantenía 70-90 % de la afinidad/capacidad de unión del anticuerpo no marcado.

Ejemplo 10 – Radioinmunoterapia con ¹⁷⁷Lu-m11B6 en un modelo de ratón de cáncer de próstata

El cáncer de próstata es el cáncer más habitualmente diagnosticado entre los hombres en el mundo occidental, representando el 25 % de todos los nuevos casos de cáncer y el 14 % de muertes de cáncer (22700443). Las estrategias de tratamiento curativo actuales (cirugía e irradiación) solamente son exitosas cuando el tumor maligno se localiza en la glándula prostática. La estrategia terapéutica en el caso de enfermedad diseminada está limitada a la castración, que con frecuencia solamente suprime el crecimiento durante 12-18 meses antes de convertirse en refractaria, a pesar del medio privado de hormonas (Scher HI *et al.*, *Cancer of the prostate*. En: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. 7^a ed. Filadelfia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005). Debido a la falta de

terapias que hayan demostrado tener un efecto más allá de una respuesta transitoria, se necesitan con urgencia terapias de dirección molecular nuevas. Debido a que el cáncer de próstata es radiosensible, presenta una diana ideal para radioinmunoterapia. Además, la radioinmunoterapia normalmente suministra altos niveles de anticuerpos en circulación a la médula ósea y ganglios linfáticos, sitios en los que normalmente se propaga el cáncer.

5 Adicionalmente, la radioinmunoterapia emplea un “efecto de fuego cruzado”, que, dependiendo de la serie de partículas emitidas del radioisótopo elegido, puede destruir células espectadoras negativas para antígeno circundantes sin unión directa del anticuerpo (16029058).

10 La kaliceína 2 humana (hK2) es una enzima conducida a andrógenos que se expresa solamente, a concentraciones muy altas, en tejido prostático sano y maligno. Ya que se ha mostrado que hK2 escinde la forma de zimógeno del Antígeno Específico de Próstata (PSA), se cree que una de sus funciones fisiológicas es actuar como un regulador de esa enzima. Tomadas juntas, estas características biológicas hacen a hK2 una diana óptima en un sistema tratánóstico (terapia y diagnóstico).

15 El objetivo de este estudio fue confirmar la utilidad de 11 B6, un mAb que se dirige específicamente a un epítipo dentro de la hendidura catalítica de hK2, como un vehículo para suministrar radionúclidos altamente tóxicos específicamente a los sitios del crecimiento de cáncer de próstata. En este estudio prueba de concepto, se eligió marcar el mAb con ¹⁷⁷Lu, una partícula beta de baja energía que también emplea emisión gamma, permitiendo realizar captura de imágenes por SPECT.

20

Materiales y Métodos

Materiales

25 Se obtuvo ¹⁷⁷Lu de Mallinkrodt Medical BV, Petten, Holanda. Se usó el Sistema de Fósforo de Almacenamiento Cyclone™ y el software de análisis de imágenes OptiQuant™ (Perkin Elmer, Wellesley, MA, Estados Unidos) para medir la radiactividad en las tiras de ITLC (cromatografía de capa fina instantánea) (Biodex, Estados Unidos) para determinar la cinética de marcaje y pureza radioquímica. Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma Aldrich y los tampones se prepararon de forma interna usando agua para uso analítico si no se indica de otro modo.

30 El mAb 11 B6 es un anticuerpo específico para la kaliceína 2 humana con una afinidad por este antígeno de aproximadamente 1,2 nM; véase SEQ ID NO: 4 y 5 anteriores (obtenidas de la Universidad de Turku, Finlandia). Para los estudios *in vivo*, se usaron las líneas celulares de carcinoma de próstata LNCaP que expresaban hK2 (ATCC, Manassas, VA, Estados Unidos). Se cultivaron células en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10 % y PEST (penicilina 100 UI/ml y estreptomina 100 µg/ml). Las células se mantuvieron a 37 °C en un incubador humidificado con CO₂ 5 % y se desprendieron con solución de tripsina-EDTA (tripsina 0,25 %, EDTA 0,02 % en tampón, Thermo Scientific).

35

Conjugación y radiomarcaje

40 *Conjugación de CHX-A¹⁷⁷-DTPA con 11B6:* Se ajustó una solución de mAb 11B6 en PBS a pH 9,2 usando tampón de borato sódico 0,07 M. La muestra se concentró en un filtro de centrífuga Amicon Ultra-2 (2 ml, 100 K). La solución de proteína se conjugó con el quelante CHX-A¹⁷⁷-DTPA (Macrocyclics, Estados Unidos) en una relación molar de 3:1 de quelante con respecto a anticuerpo a 40 °C. La reacción se terminó después de 4 h y CHX-A¹⁷⁷-DTPA-11 B6, en lo sucesivo denominado DTPA-11 B6, se separó de quelado libre mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna NAP-5 (GE Healthcare) equilibrada con 20 ml de tampón de acetato de amonio 0,2 M, pH 5,5. Se eluyeron 11 B6 y 5A10 conjugados con 1 ml de tampón de acetato de amonio.

45

Radiomarcaje de DTPA-11B6: Se mezcló DTPA-11B6 en tampón de acetato de amonio pH 5,5 con una cantidad predeterminada de ¹⁷⁷LuCl₃. Después de incubación a temperatura ambiente durante 2 h, el marcaje se terminó y purificó en una columna NAP-5, equilibrada con PBS. Se supervisó la eficacia de marcaje y la cinética de marcaje con tiras de ITLC, eluidas con ácido cítrico 0,2 M. En este sistema, el conjugado radiomarcado permanece en la línea de origen, mientras que Lu-177 libre migra con el frontal del disolvente. La distribución de radiactividad se determinó con un sistema de captura de imágenes fotoestimulable (Perkin Elmer, Wellesley, MA, Estados Unidos) usando el OptiQuant como software de cuantificación (Perkin Elmer, Wellesley, MA, Estados Unidos).

50

Resonancia de Plasmón Superficial

La proteína hK2 (Departamento de Biotecnología, Turku, Finlandia) en tampón de NaAc 10 mM, pH 4,0, se inmovilizó en una microplaca de uso en investigación CM4 obtenida de Biacore mediante acoplamiento de amina usando N-hidroxisuccinimida (NHS), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y clorhidrato de etanolamina-NaOH 1 M pH 8,5 en un sistema Biacore 2000. El mAb 11B6, su conjugado DTPA-11B6 y Herceptina como un mAb de referencia no específico, todo en tampón de Biacore se pasó sobre dos celdas de flujo en cinco concentraciones diferentes (0,5 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM y 100 nM) para detectar unión eventual. Una de las dos celdas de flujo contenía hK2 inmovilizada y la otra era una referencia en blanco. La microplaca se regeneró usando tampón de Glicina 25 mM, pH 2,7.

65

Estudios de estabilidad in vitro

La estabilidad de los conjugados marcados se ensayó en PBS y en un exceso de EDTA, 500x más EDTA, después DTPA conjugado en m11B6, incubado a 4 °C durante 1 semana y 2 semanas y se analizaron usando tiras de ITLC, véase anteriormente.

Estudios animales

Todos los experimentos de animales se realizaron de acuerdo con la legislación nacional sobre protección de animales de laboratorio. El estudio animal se ha aprobado por el Comité de Ética Local para Investigación Animal. Se usaron ratones desnudos inmunodeficientes macho, NMRI, (6-8 semanas de vida) obtenidos de Taconic Europe (Bomholt, Dinamarca) para este estudio.

Se implantaron xenoinjertos de células de carcinoma de próstata LnCAP que expresaban hK2 por vía subcutánea en el flanco derecho y/o flanco izquierdo a aproximadamente 10×10^6 células por inyección.

Los animales que desarrollaron tumores LNCaP se dividieron en grupos y se les inyectó el agente terapéutico $^{177}\text{Lu-DTPA-11 B6}$ o un control, véase Tabla 1 a continuación:

20

Tabla 1

<i>Animales</i>	<i>n.º de grupo</i>	<i>Tratamiento</i>
5 animales/grupo	1	NaCl (control)
	2	Ab no específico marcado con ^{177}Lu – dosis absorbida baja
	3	Ab no específico marcado con ^{177}Lu – dosis absorbida alta
	4	Solamente ^{177}Lu - dosis absorbida baja
	5	Solamente ^{177}Lu - dosis absorbida alta
11 grupos	6	$^{177}\text{Lu-DTPA-m11B6}$: A/4
	7	$^{177}\text{Lu-DTPA-m11B6}$: A/2
	8	$^{177}\text{Lu-DTPA-m11B6}$: A
Total = 55 animales	9	$^{177}\text{Lu-DTPA-m11B6}$: 2*A
	10	$^{177}\text{Lu-DTPA-m11B6}$: 3*A
	11	Solamente m11B6
		<i>A = 26,7 MBq</i>

Todos los animales incluidos se midieron de forma continua y se pesaron en un intervalo de 3-4 días.

Inicialmente algunos animales obtuvieron una actividad menor (8 MBq) de $^{177}\text{Lu-DTPA-11B6}$ para investigación de la localización del agente terapéutico usando SPECT. También se estudió un ratón del grupo 8 con SPECT. Se retiraron los órganos de estos animales y se usó un contador de pocillos NaI(Tl) automático con un detector de NaI (TI) de 7,62 cm (1480 WIZARD, Wallac Oy, Turku, Finlandia) para cuantificar la radiactividad en estas muestras tisulares.

Para estudiar el efecto en la médula ósea se tomaron regularmente muestras sanguíneas (10 μl). Se recogieron muestras de sangre dos veces por semana durante 8 semanas después de la inyección y se analizaron recuentos de WBC, recuentos de RBC y recuentos de plaquetas en un Analizador Celular Medonic-Vet CA530 Vet (Boule Medical, Estocolmo, Suecia). En el momento de la toma de muestras sanguíneas, se supervisó el peso y la condición física de los animales. La toxicidad se evaluó supervisando los animales con respecto a pérdida de peso corporal, deterioro de la condición general y toxicidad hematológica. El volumen tumoral se midió con un calibre. Se midió la longitud l, con w y grosor t y se calculó el volumen.

Farmacocinética

Para el estudio de biocinética de $^{111}\text{In-m11B6}$, se inyectó a ratones en una vena de la cola radionúclido marcado con 25 μg de anticuerpo m11B6. Los animales se sacrificaron a intervalos temporales regulares.

Brevemente, el mAb 11B6 de ratón se conjugó con CHX-Aⁿ-DTPA y se marcó con ^{111}In formando $^{111}\text{In-CHXA}^n\text{-DTPA-11B6}$ ($^{111}\text{In-DTPA-11B6}$). Se realizaron estudios de biodistribución en un modelo de xenoinjerto de (LNCaP) PCa hK2 y AR positivo. Se usaron xenoinjertos de DU-145 (hK2 y AR negativos) como control. Se sacrificaron animales, NMRI, desnudos, a intervalos temporales designados, se diseccionaron y se retiraron sus órganos para medición de la actividad. Se realizó captura de imágenes de micro-SPECT. Los tumores se seccionaron, se tiñeron y se realizó autorradiografía. A algunos animales se les inyectaron mAb 11 B6 de ratón frío antes de la inyección de $^{111}\text{In-DTPA-11B6}$ para bloquear la captación de 11 B6 radiomarcado.

50

Se obtuvo la biocinética de $^{177}\text{Lu-m11B6}$ de la misma manera que para el estudio de $^{111}\text{In-m11B6}$.

Adquisición de datos y dosimetría

Para determinar la dosis absorbida en los diferentes órganos diana, se aplicó el esquema de MIRD (1) junto con factores S específicos de ratón. El número de disgregaciones (actividad acumulada) se derivó a partir de los datos cinéticos con ¹¹¹In-m11B6. Las funciones biexponenciales se ajustaron a los puntos de datos mediante un algoritmo de mínimos cuadrados, y se calcularon los números de disgregaciones como la integral de estas expresiones multiplicada por el factor de desintegración. La actividad acumulada para la médula ósea se basó en el método sanguíneo (2), en el que se supone que la concentración de la actividad de la médula roja es proporcional a la concentración de actividad en sangre. Se ha sugerido que esta relación de médula roja con respecto a sangre (RMBLR) es 0,36 (2), lo que también se usó en este estudio.

Para determinar los factores S específicos de ratón, se usó una versión del fantasma de MOBY (3) en el que pudieron especificarse los tamaños de los órganos. El peso promedio de los órganos diseccionados del estudio de cinética se especificó junto con el peso promedio total. La generación de las superficies de NURBS flexibles genera entonces un fantasma específico de cepa. El fantasma se voxeliza en 160*160*400 vóxeles. Se añadió un tumor subcutáneo en el flanco izquierdo, mediante la representación de una esfera fuera del contorno de piel normal, pero como un elipsoide con un eje corto hasta la mitad del radio de esfera perpendicular al contorno de la piel, y siendo el eje largo como el radio de la esfera. La glándula salivar y la glándula prostática se añadieron manualmente al fantasma y se representaron como esferas con radio correlacionado con los pesos promedio de los órganos.

El fantasma actuó después como entrada para simulaciones Monte Carlo de factores S para ¹⁷⁷Lu y ¹¹¹In con el código MCNPX 2.6 como se ha descrito en trabajos anteriores (4).

Planificación de la terapia

Basándose en la relación entre la dosis absorbida y el efecto biológico en la médula ósea en ratas que se someten a Radioinmunoterapia con ⁹⁰Y y ¹⁷⁷Lu (Larsson *et al.*, 2012, Med. Phys. 39(7): 4434-43) podría estimarse que la DL50 para médula ósea estaría en el orden de 12 Gy. En la bibliografía DL50 para irradiación aguda de ratas y ratones son iguales, aproximadamente 9 Gy (por ejemplo, véase *Radiobiology for the radiologist*, Hall & Giacca (Eds), 2006, 6ª edición).

Las terapias se diseñaron entonces desde la suposición de una dosis absorbida tolerable de 12 Gy a la médula ósea. Después a partir de los cálculos de dosimetría se calculó la actividad correspondiente a esta dosis absorbida. Los grupos de terapia se diseñaron después proporcionándoles A/4, A/2, A, 2xA y 3xA. Se usaron actividades correspondientes para los controles.

Resultados

Radiomarcaje de ¹⁷⁷Lu-DTPA-m11B6

Los resultados de cinética de marcaje en la Figura 16 muestran que la eficacia de marcaje es muy alta, alcanzando el 90 % después de 2 horas incubación. Esto asegura una probabilidad de eficacia excelente con efectos menores de ¹⁷⁷Lu no conjugado.

Los resultados de estabilidad *in vitro* en PBS y EDTA muestran buena estabilidad a lo largo del tiempo con casi ningún cambio en el tiempo en dos semanas (véase Figura 17). Además, no se puede ver ninguna diferencia entre incubación con PBS y EDTA, lo que indica una química de conjugación muy buena que asegura la estabilidad *in vivo* con largos tiempos de conservación y circulación.

Obtención de imágenes

Las imágenes de SPECT en la Figura 18 muestran la distribución de ¹⁷⁷Lu-DTPA-m11B6 en ratones desnudos con xenoinjertos (con inyección de 8 MBq).

Las diferentes imágenes de la Figura 18 son como se explica en la Tabla 2.

Tabla 2

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4
S1:48h			
S1: 72 h	S2: 72 h	S3: 72 h	S11: 72 h DU 145
S1: 168 h	S2: 168 h	S8: 168h Bloqueado	S9: 168 h Bloqueado

La primera columna para S1 de ratón muestra la excelente captación en el tumor en S1 de ratón con una captación aumentada con el tiempo 48, 72 y 168 h pi. La segunda columna muestra S2 de ratón a 72 y 168 h con la misma captación de tumor alta. La columna 3, fila 2 muestra S3 de ratón a 72 h pi con captación tumoral alta similar. La fila 3, columna 3 muestra S8 de ratón a 168 h pi sin captación tumoral después del bloqueo con anticuerpos fríos que

muestran la especificidad de m11B6 para dirección tumoral. Resultados similares para S9 de ratón en la columna 4, fila 3. Finalmente S11 de ratón en la columna 4, fila 2 muestra ausencia de captación en tumor de línea celular DU 145 no específica para el anticuerpo m11B6.

5 Estos resultados demuestran la alta especificidad de m11B6 que da como resultado alta acumulación tumoral.

Biodistribución

10 Los resultados del estudio de biocinética del 111In-m11B6 se analizaron en el Ejemplo 2 anterior. Se ve una acumulación en el tejido tumoral con un máximo de 16 % de AI/g a 48 horas; todos los otros órganos muestran un deterioro de la actividad excepto las glándulas salivares (véase Figura 8). Por lo tanto, se obtiene una alta relación de órgano tumoral frente a normal, que es un prerrequisito para la alta eficacia terapéutica.

15 Se muestran datos de biodistribución para 177Lu-m11B6 (a 72 h y 168 h) en la Figura 19. Aquí, puede verse una acumulación mucho mayor de actividad en comparación con 111In-m11B6, con casi 30 % de AI/g a 168 h. Esto subraya adicionalmente la viabilidad de alta eficacia terapéutica con anticuerpo 11 B6 radiomarcado.

20 Los resultados detallados a 72 h pi de bloqueo junto con el uso de la línea celular tumoral DU-145 se muestran en la Figura 20. Aquí, se proporcionan la distribución del 177Lu-DTPA-m11B6 del estudio SPECT mostrado anteriormente en ratones con LnCaP o DU-145 y el bloqueo del Ag hK2 con preinyección de 11 B6 no conjugado. Como se ve en detalle el bloqueo y la línea celular tumoral DU-145 no dan como resultado ninguna captación en los tumores que muestran la alta especificidad de m11B6.

Dosimetría

25 La Figura 21 muestra los resultados del estudio de biocinética de 111In-m11B6 usado para los cálculos de dosimetría. En cada gráfica dentro de la figura compuesta, la línea discontinua superior representa los resultados del estudio cinético con una desviación convencional, la curva continua es una función bi-exponencial adaptada y la curva discontinua inferior es la consideración de la degradación de 111In. El área bajo la curva discontinua inferior es la actividad acumulada usada en los cálculos de dosimetría.

30 Basándose en la biocinética como se muestra en la Figura 21, se calcularon las actividades acumuladas. Usando los valores S de 111In, se calculó después la dosis absorbida por unidad de actividad (Gy/MBq). En la Tabla 3 a continuación se proporcionan los resultados para 111In.

35 Basándose en la suposición de que la misma biocinética puede usarse para 177Lu-m11B6, se calcularon las actividades acumuladas correspondientes con su tiempo medio físico. Cuando se usaron los valores de S para 177Lu, se calculó la dosis absorbida por unidad de actividad. La suposición de biocinética similar se justifica por los resultados de la captación de 177Lu-m11B6 que muestran valores de captación similares al orden (véase Figuras 8 y 19).

Tabla 3
Dosis absorbida (Gy/MBq) de terapia con
¹¹¹In y ¹⁷⁷Lu-11B6

Órgano	¹¹¹ In		¹⁷⁷ Lu	
	Dosis propia	Dosis total	Dosis propia	Dosis total
Resto	0,072	0,081	0,504	0,516
Sangre	0,195	0,235	1,207	1,283
Corazón	0,076	0,133	0,442	0,622
Pulmón	0,059	0,106	0,396	0,532
Hígado	0,102	0,130	0,636	0,666
Bazo	0,082	0,115	0,670	0,716
Tracto GI	0,041	0,073	0,246	0,298
Riñón	0,088	0,122	0,491	0,525
Tiroides	0,001	0,041	0,006	0,094
Hueso	0,020	0,086	0,131	0,267
Cerebro	0,003	0,025	0,017	0,039
Próstata	0,036	0,075	0,236	0,295
Testículos	0,031	0,061	0,246	0,294
Glándulas salivares	0,223	0,249	1,885	1,926
Tumor	0,294	0,312	2,236	2,252
Médula ósea	0,063	0,092	0,386	0,452

45 Basándose en un valor de DL50 de 12 Gy de médula ósea, se puede inyectar una dosis de 26,7 MBq. Esto significa una dosis absorbida para el tumor de 60 Gy.

El recálculo de la dosis absorbida por el tumor (suponiendo que la cinética de 111-In-m11B6 es la misma que para

177Lu-m11B6) y los cambios de valores de captación a 72 h pi (16 % de AI/g hasta 20 % de AI/g) y a 168 h pi (15 % de AI/g a 28 % de AI/g) da como resultado las dosis absorbidas como se proporcionan en la Tabla 4 posterior. Puede verse entonces que la dosis absorbida por el tumor aumentará de 60 Gy a 120 Gy.

5

Tabla 4

Órgano	Dosis propia	Dosis absorbida total
Resto	0,494456	0,507415
Sangre	1,20655	1,28288
Corazón	0,441901	0,621222
Pulmón	0,396110	0,530831
Hígado	0,636344	0,665149
Bazo	0,669825	0,715375
Tracto GI	0,245824	0,297540
Riñón	0,490722	0,524355
Tiroides	0,00649596	0,0923319
Hueso	0,131186	0,266107
Cerebro	0,0170275	0,0386855
Próstata	0,236380	0,293902
Testículos	0,246161	0,293579
Saliva	1,88491	1,92563
Tumor	4,48777	4,50278
Médula ósea	0,386496	0,451228

Los cálculos de dosimetría anteriores se basan en un modelo de dosimetría apropiado; la biocinética revela que puede suministrarse una dosis absorbida terapéutica a los tumores dentro de límites seguros para la toxicidad de la médula ósea.

10

Encogimiento de tumor animal

La Figura 22 muestra cómo el tumor en uno de los ratones (visible en el flanco del animal, bajo la piel) reduce su volumen después del tratamiento.

15

Resultados de radioinmunoterapia

La Figura 23 muestra los resultados para los grupos de estudio como actividades administradas (a) D, (b) 2 x D y (c) un grupo de control (en el que D = 26,7 MBq).

20

Existe una clara tendencia a la reducción del volumen tumoral en ambos grupos de tratamiento. La aparición del encogimiento del tumor ya se ha visto algunos días después de la inyección de 177Lu-m11B6. En el grupo de control hay un aumento del volumen tumoral después de la inyección de solución de NaI.

25

La Figura 24 (a) muestra los resultados para uno de los ratones en el grupo al que se inyectó actividad A. Aquí, el tumor crece continuamente desde el día uno hasta día seis cuando se administra actividad A de 177Lu-m11B6. Después del tratamiento, se observa una reducción rápida del volumen tumoral.

30

En el estudio de SPECT (8 d pi) el volumen tumoral se muestra con actividad aún presente; véase Figura 24(b).

Conclusión

El presente estudio con el anticuerpo a modo de ejemplo 177Lu-m11 B6 claramente demuestra una eficacia terapéutica contra tumores de cáncer de próstata *in vivo*.

35

Tanto los cálculos teóricos basados en el modelo de dosimetría especial como la biocinética medida *in vivo* muestran dosimetría favorable que proporciona una alta relación terapéutica. Esto se verifica después en el estudio animal con buenos resultados de terapia que muestran rápido encogimiento de volumen tumoral.

40

Referencias

1. Bolch WE, Eckerman KF, Sgouros G, Thomas SR. MIRDO pamphlet N.º 21: a generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry--standardization of nomenclature. J Nucl Med. 2009; 50: 477-484.

45

2. Sgouros G. Bone marrow dosimetry for radioimmunotherapy: theoretical considerations. J Nucl Med. 1993; 34: 689-694.

3. Segars WP, Tsui BM, Frey EC, Johnson GA, Berr SS. Development of a 4-D digital mouse phantom for molecular imaging research. Mol Imaging Biol. 2004; 6: 149-159.

4. Larsson E, Strand SE, Ljungberg M, Jönsson BA. Mouse S-factors based on Monte Carlo simulations in the anatomical realistic Moby phantom for internal dosimetry. *Cancer Biother Radiopharm.* 2007; 22: 438-442.
5. Erik Larsson, Michael Ljungberg, Linda Mårtensson, Rune Nilsson, y Jan Tennvall, Sven-Erik Strand y Bo-Anders Jönsson Use of Monte Carlo simulations with a realistic rat phantom for examining the correlation between hematopoietic system response and red marrow absorbed dose in Brown Norway rats undergoing radionuclide therapy with ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-BR96 mAbs Medical.
10. Linda Mårtensson, Zhongmin Wang, Rune Nilsson, Tomas Ohlsson, Peter Senter, Hans-Olov Sjö gren, Sven-Erik Strand, Jan Tennvall, Determining Maximal Tolerable Dose of the Monoclonal Antibody BR96 Labeled with ⁹⁰Y or ¹⁷⁷Lu in Rats: Establishment of a Syngeneic Tumor Model to Evaluate Means to Improve Radioimmunotherapy *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7104s-7108s. 2005.

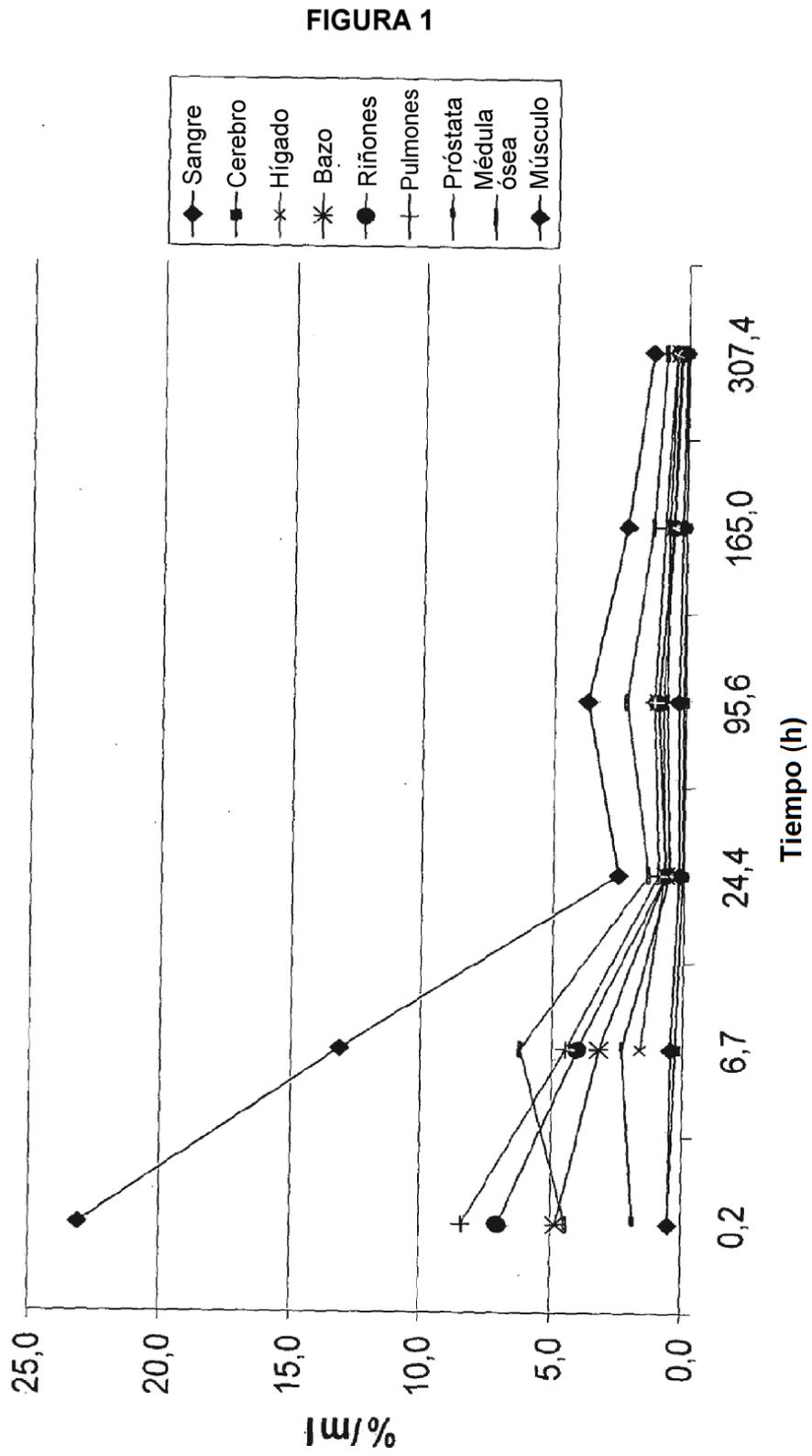
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente que comprende o consiste en (a) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad por kaliceína glandular humana (hK2) y (b) un resto citotóxico, para uso en el tratamiento del cáncer
- 10 2. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad por hK2 compiten por la unión a hK2 con el anticuerpo 11 B6, en donde el anticuerpo 11 B6 comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- 15 3. Un agente para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad por hK2 comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo 11 B6, en donde el anticuerpo 11 B6 comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- 20 4. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el agente comprende o consiste en el anticuerpo 11 B6 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo 11 B6 comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
- 25 5. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad por hK2 están unidos indirectamente al resto citotóxico.
- 30 6. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad por hK2 están unidos directamente al resto citotóxico.
- 35 7. Un agente para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6 en donde el agente presenta características de captación tumoral sustancialmente equivalentes a las características de captación tumoral del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo con especificidad por hK2 solo.
- 40 8. Un agente para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que el resto citotóxico comprende o consiste en uno o más radioisótopos.
- 45 9. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que cada uno de uno o más radioisótopos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en emisores beta, emisores de Auger, emisores de electrones de conversión, emisores alfa y emisores de baja energía fotónica.
- 50 10. Un agente para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 en el que cada uno de uno o más radioisótopos tienen independientemente un patrón de emisión de energía absorbida localmente que crea una absorbancia de alta dosis en las cercanías del agente.
- 55 11. Un agente para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que cada uno de uno o más radioisótopos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en emisores beta de largo alcance, tales como ^{90}Y , ^{32}P , ^{186}Re ; ^{166}Ho , $^{76}\text{As}/^{77}\text{As}$ o ^{89}Sr , ^{153}Sm , emisores beta de medio alcance, tales como ^{131}I , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{161}Tb o ^{105}Rh , emisores beta de energía baja, tales como ^{45}Ca o ^{35}S , emisores de conversión o de Auger, tales como ^{51}Cr , ^{67}Ga , $^{99}\text{Tc}^m$, ^{111}In , ^{114m}In , ^{123}I o ^{125}I , ^{201}Tl , y emisores alfa, tales como ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ac , ^{225}Ac , ^{212}Pb , ^{255}Fm , ^{223}Ra , ^{149}Tb y ^{221}At .
- 60 12. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que el resto citotóxico comprende o consiste en uno o más fármacos citotóxicos.
- 65 13. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que cada uno de uno o más fármacos citotóxicos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un fármaco citostático; un fármaco anti-andrógeno; cortisona y derivados de la misma; un fosfonato; un inhibidor de testosterona-5- α -reductasa; un adjunto de boro; una citocina; taspigargina y sus metabolitos; una toxina (tal como saporina o calicheamicina); un agente quimioterapéutico (tal como un antimetabolito); o cualquier otro fármaco citotóxico útil en el tratamiento de carcinoma prostático.
14. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el resto citotóxico comprende o consiste en uno o más restos adecuados para uso en terapia de activación, tal como terapia de activación de fotones, terapia de activación de neutrones, terapia de electrones de Auger inducidos por neutrones, terapia de irradiación de sincrotrones o terapia de activación de fotones por rayos X de baja energía.
15. Un agente para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 11, en el que el radioisótopo es capaz de actuar

simultáneamente de una manera multimodal como un resto detectable y también como un resto citotóxico.

- 5 16. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el agente comprende además un resto para aumentar la semivida *in vivo* del agente.
- 10 17. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el resto para aumentar la semivida *in vivo* se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), albúmina de suero humano, grupos de glucosilación ácidos grasos y dextrano.
- 15 18. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el cáncer de próstata que hay que tratar es cáncer de próstata no localizado (es decir, diseminado).
19. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el cáncer de próstata que hay que tratar es cáncer de próstata metastásico, opcionalmente cáncer de próstata micrometastásico.
- 20 20. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el cáncer de próstata metastásico que hay que tratar es metástasis del sistema linfático; metástasis del hueso (incluyendo columna vertebral, vértebras, pelvis y/o costillas); metástasis dentro de la pelvis, recto, vejiga y/o uretra.
- 25 21. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el paciente tiene cáncer de próstata y tiene una edad menor de 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40 años, o menor, en el momento del diagnóstico de cáncer de próstata y/o en el momento del tratamiento.
22. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el paciente se **caracteriza por que** a un miembro de la familia, tal como el padre o un hermano, se les ha diagnosticado anteriormente cáncer de próstata.
23. Un agente para uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en donde el cáncer de próstata que hay que tratar es cáncer de próstata resistente a castración (CRPC).

Cinética normal de PSA30



Cinética tumoral de PSA30

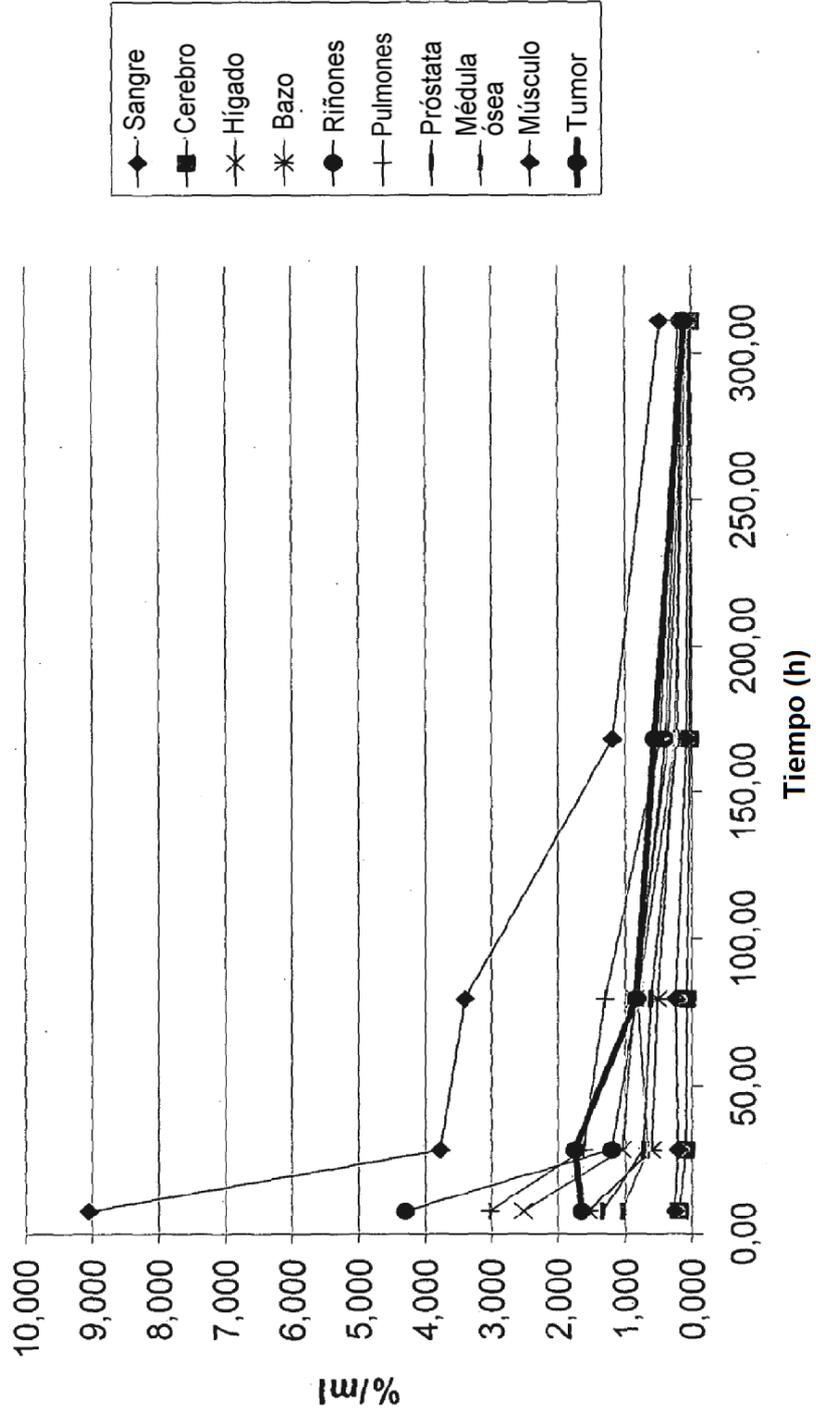


FIGURA 3

TABLA 3. RELACIONES DE TUMOR CON RESPECTO A ÓRGANO (n = 34)

Tejido	4 h (n = 8)	24 h (n = 8)	72 h (n = 8)	168 h (n = 5)	312 h (n = 5)
Sangre	0,44	0,78	0,35	0,47	0,22
Bazo	2,65	4,21	1,85	2,27	1,41
Pulmones	1,26	1,83	0,82	1,19	0,55
Riñones	1,05	2,61	1,37	1,43	0,70
Hígado	1,72	2,61	1,30	1,62	1,05
Médula ósea	1,94	3,12	1,06	2,36	1,37
Próstata	3,05	4,44	1,95	2,57	0,73
Músculo	13,25	15,52	4,66	7,25	2,57
Cerebro	11,56	32,83	16,15	21,40	8,80

FIGURA 4 (A y B)

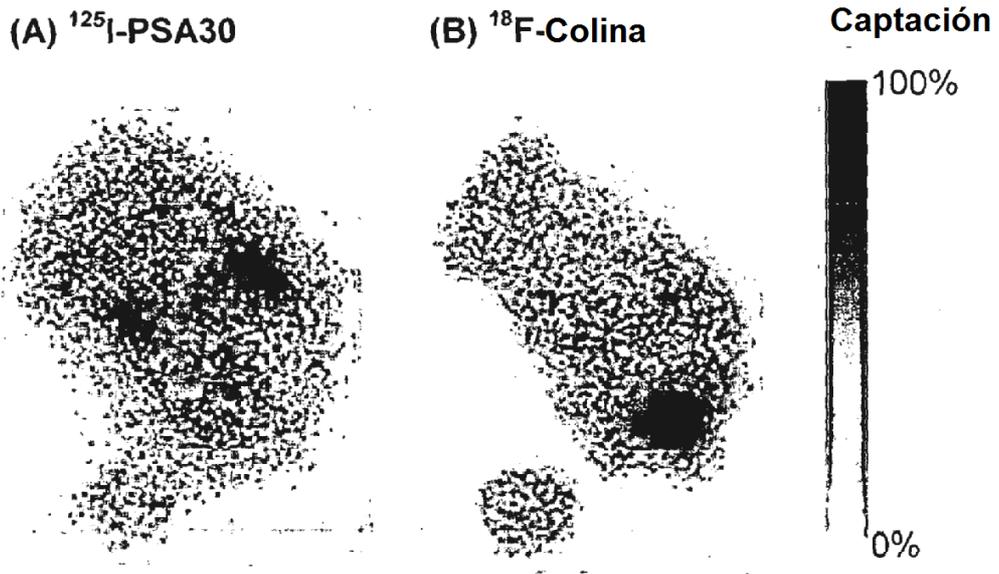


FIGURA 4 (C y D)

C) Tinción con H y E

D) Tinción con IHC

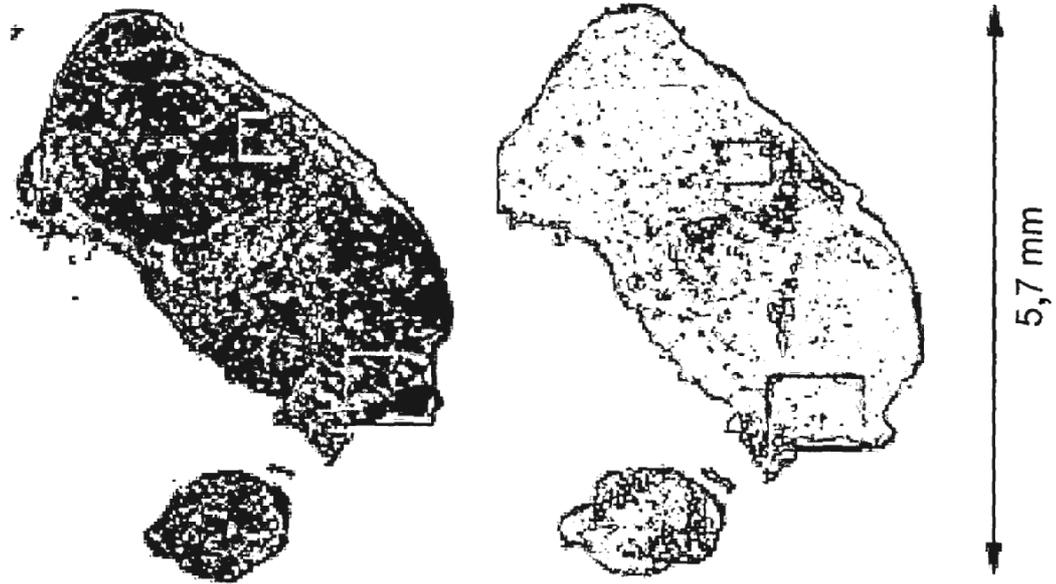
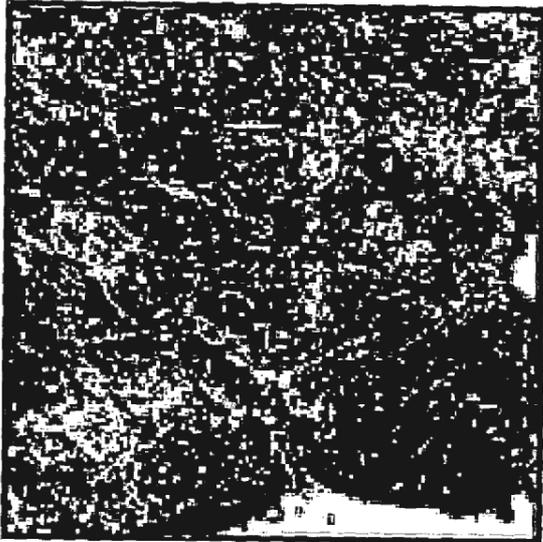


FIGURA 4 (E y F)

(E)



(F)

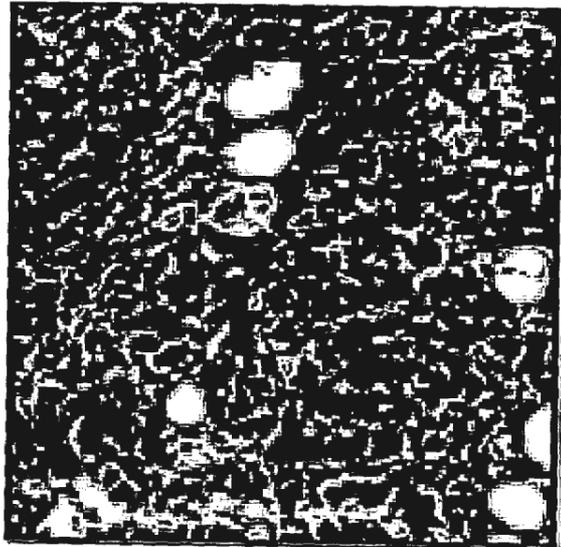


FIGURA 4 (G y H)

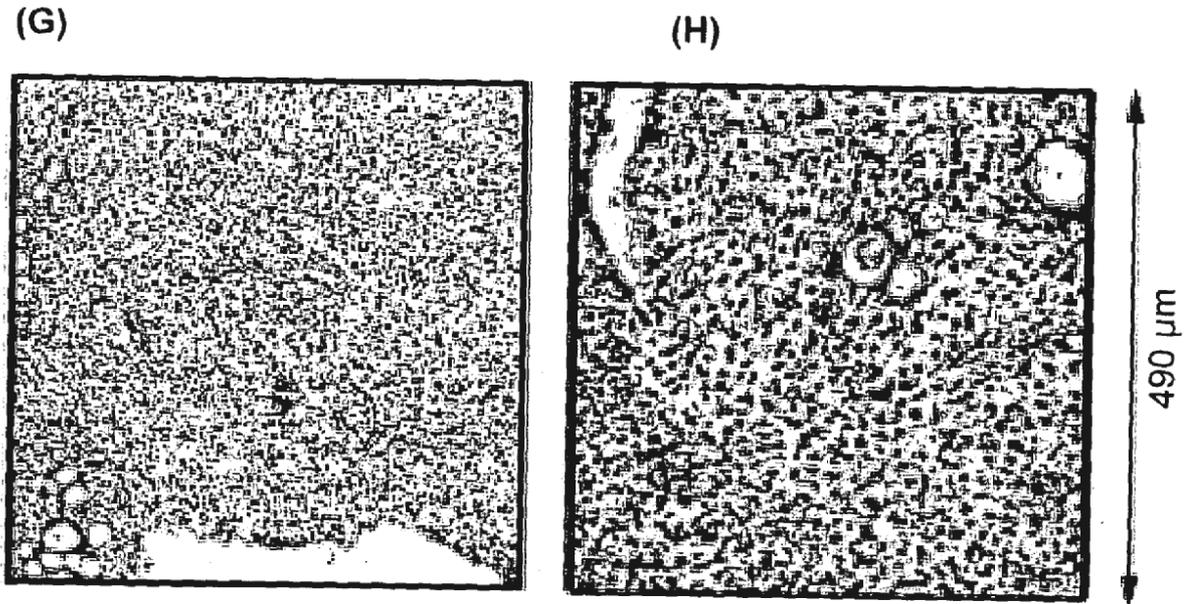
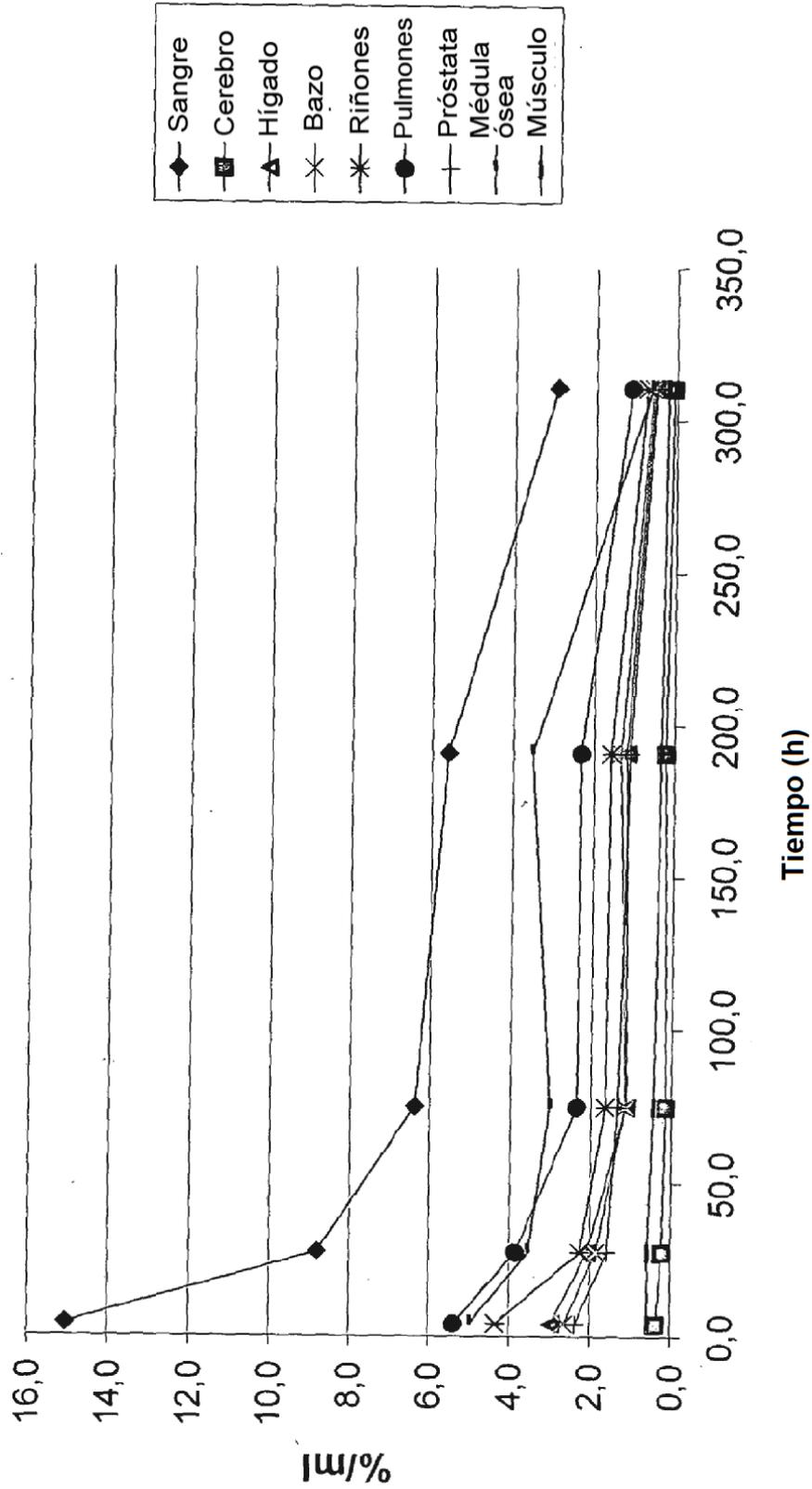
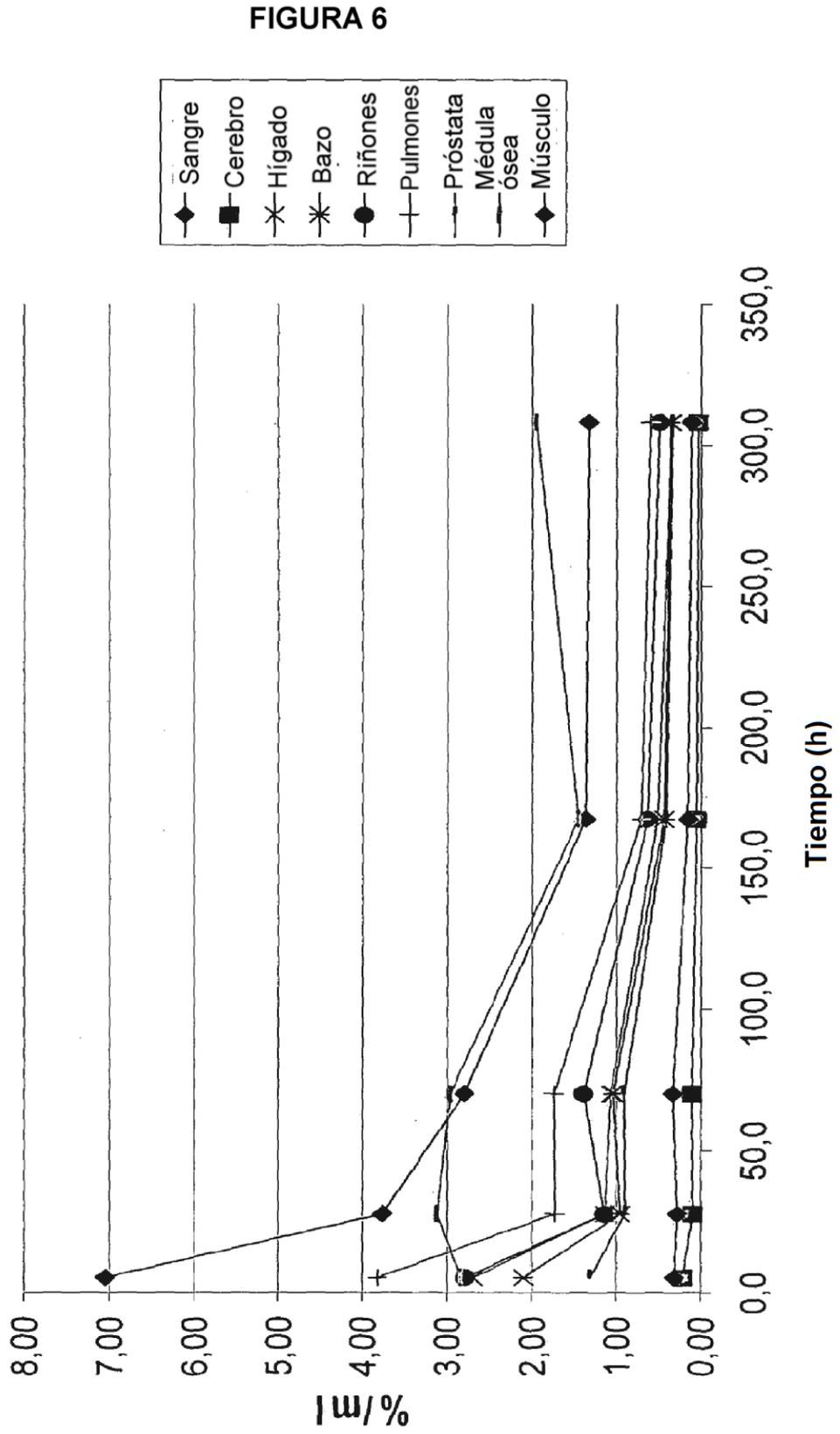


FIGURA 5

Cinética normal de 5A10



Cinética normal de 11B6



Cinética tumoral de 11B6

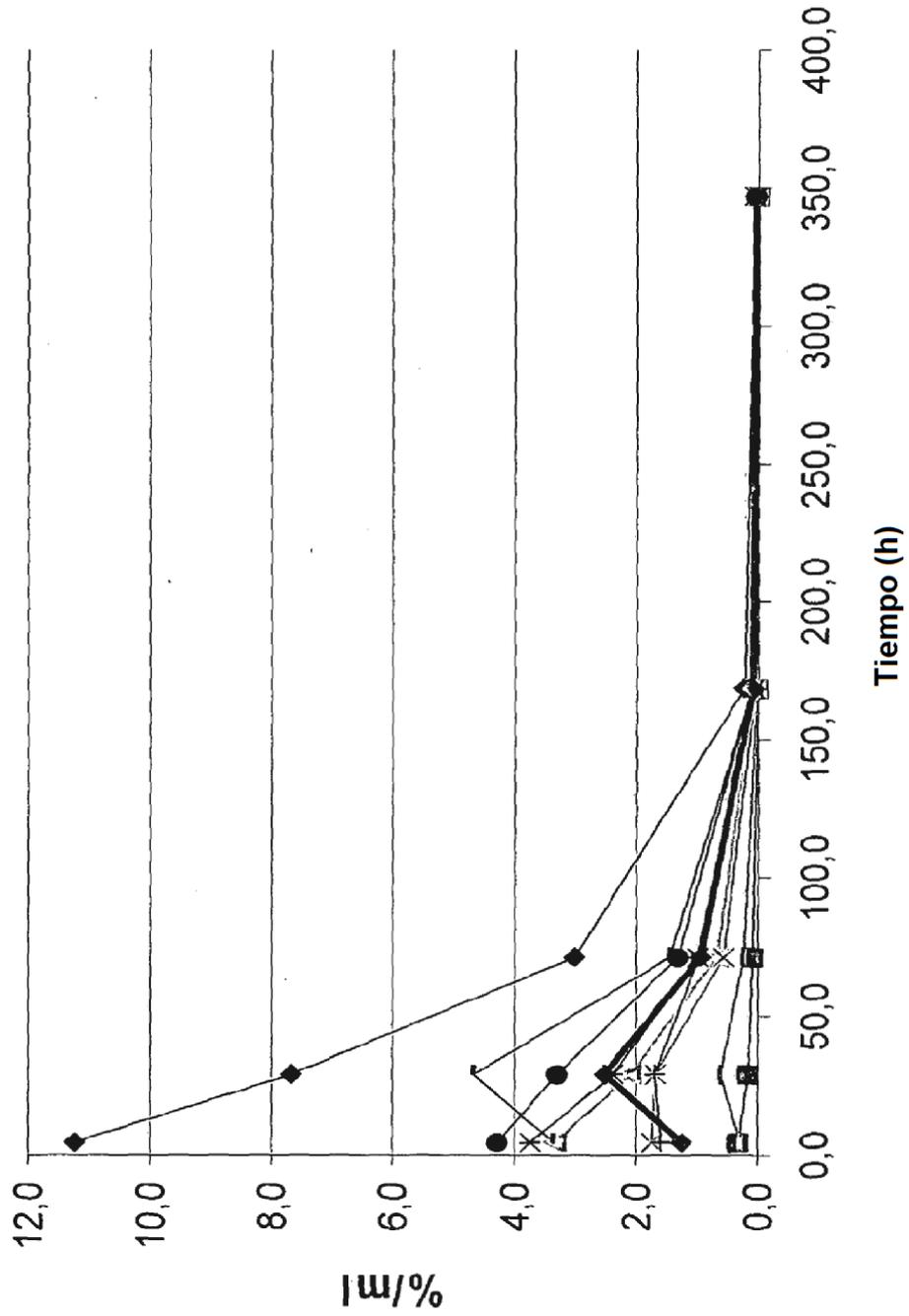
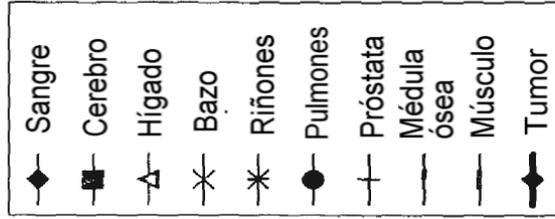


FIGURA 7



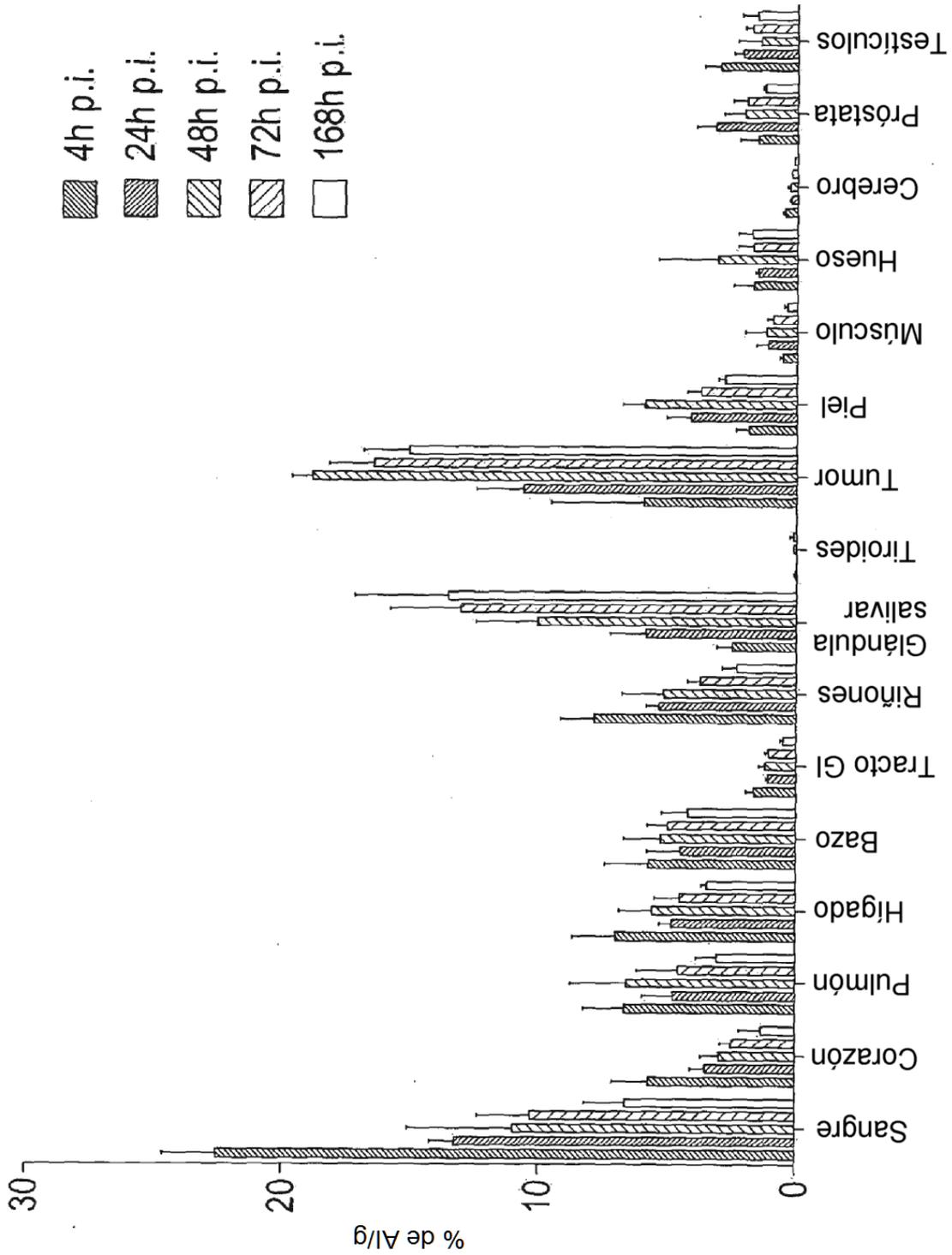


FIGURA 8

FIGURA 9

Emisiones de radionúclidos en partículas

- beta de largo alcance
 - Alcance > 1mm
 - ^{90}Y , ^{32}P , ^{186}Re
- beta de medio alcance
 - Alcance > 200 μm
 - ^{131}I , ^{177}Lu
- beta de baja energía
 - Alcance < 200 μm
 - ^{45}Ca , ^{35}S , ^{14}C
- Electrones de Auger y conversión
 - Alcance μm – nm
 - ^{51}Cr , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{201}Tl

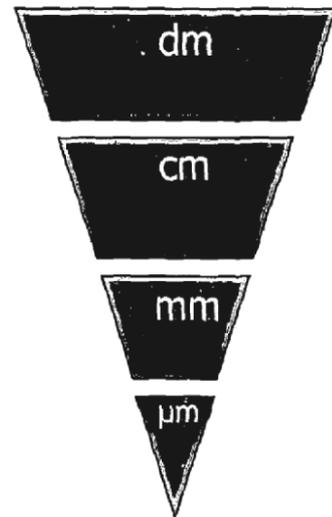


FIGURA 10

Agente de dirección tumoral

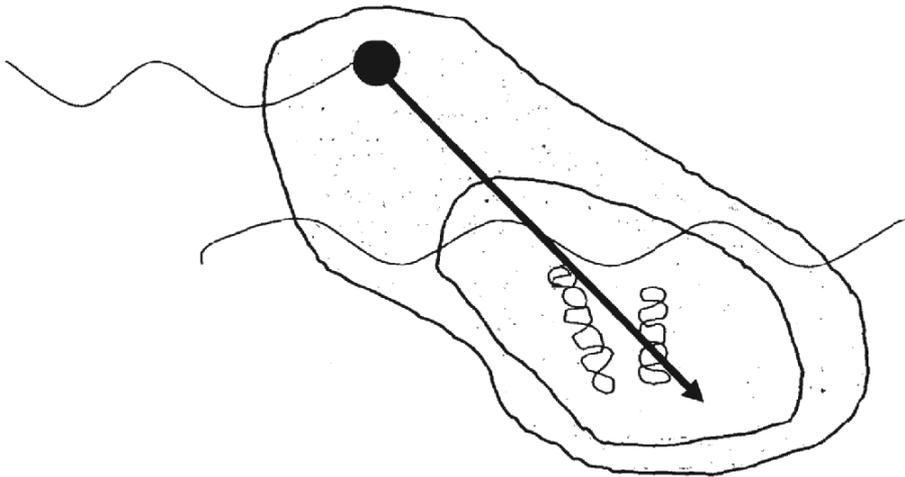


FIGURA 11

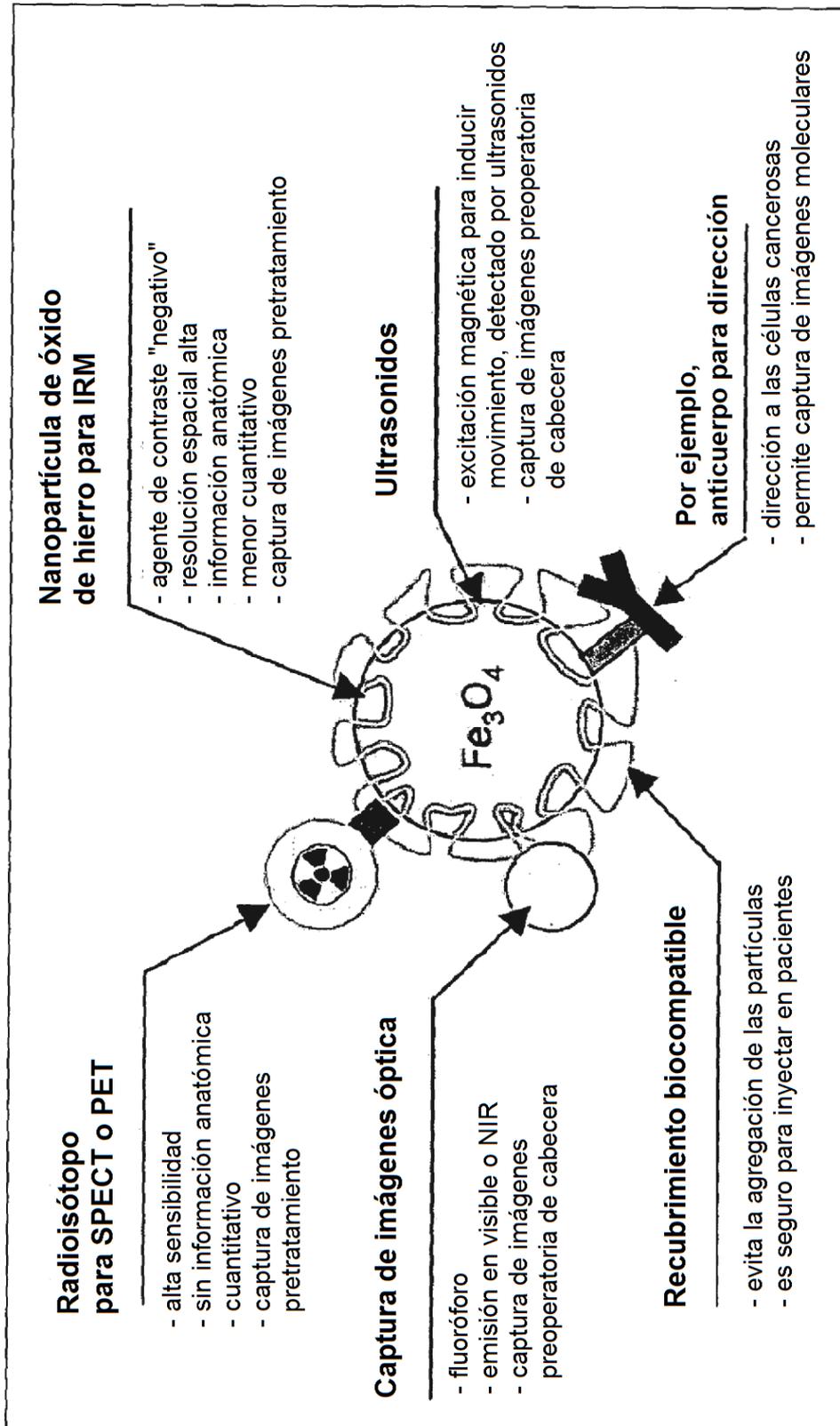
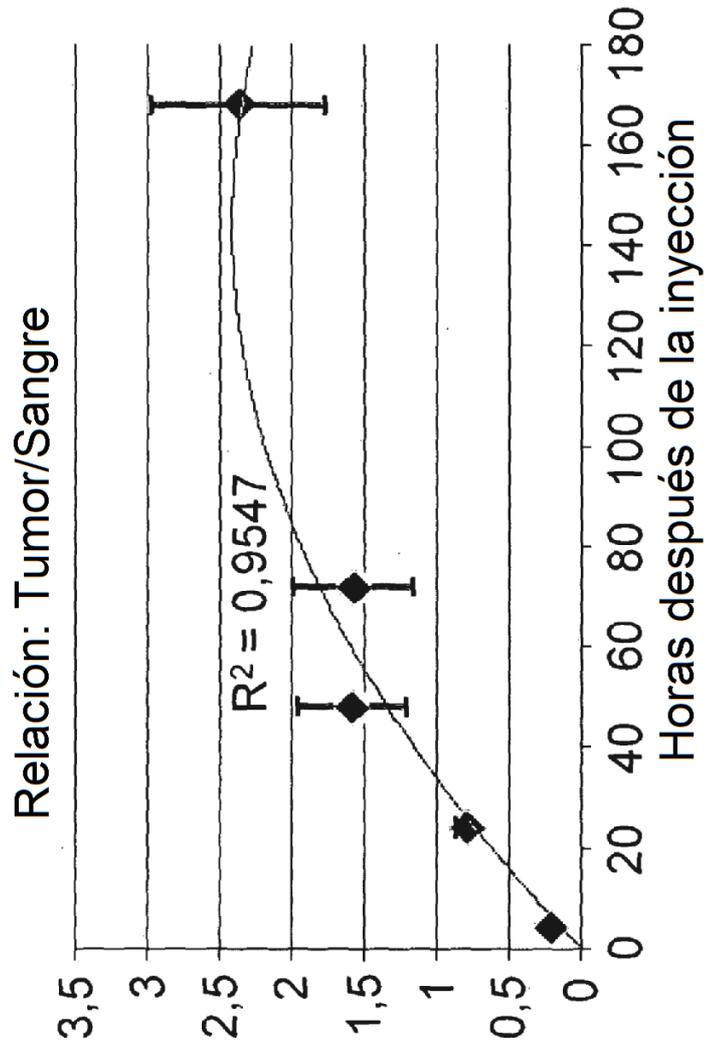


FIGURA 12



Comparación de ¹¹¹In-11B6 en ratones que portan xenoinjerto de LNCaP y DU145 a 48 h pi

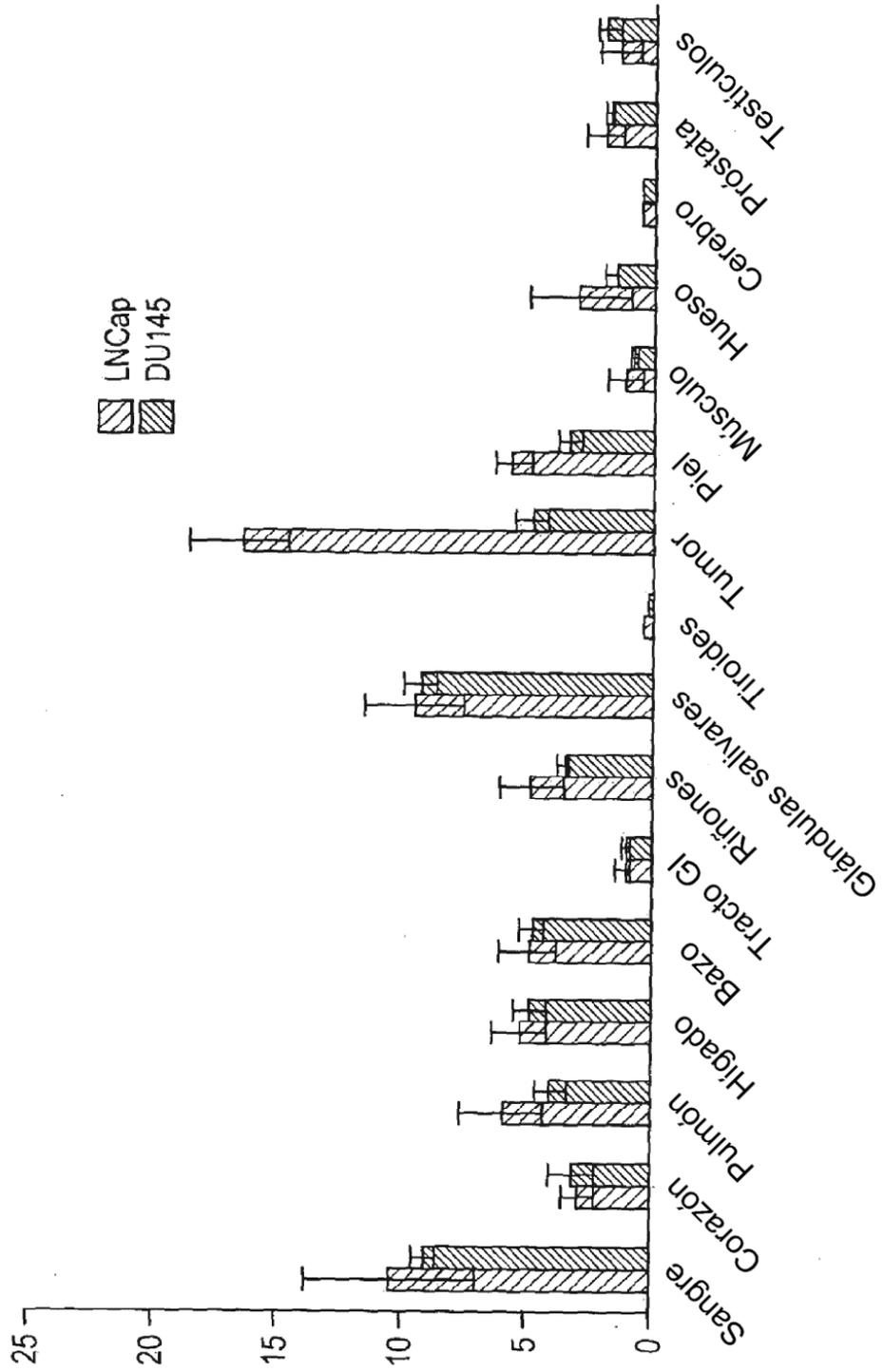


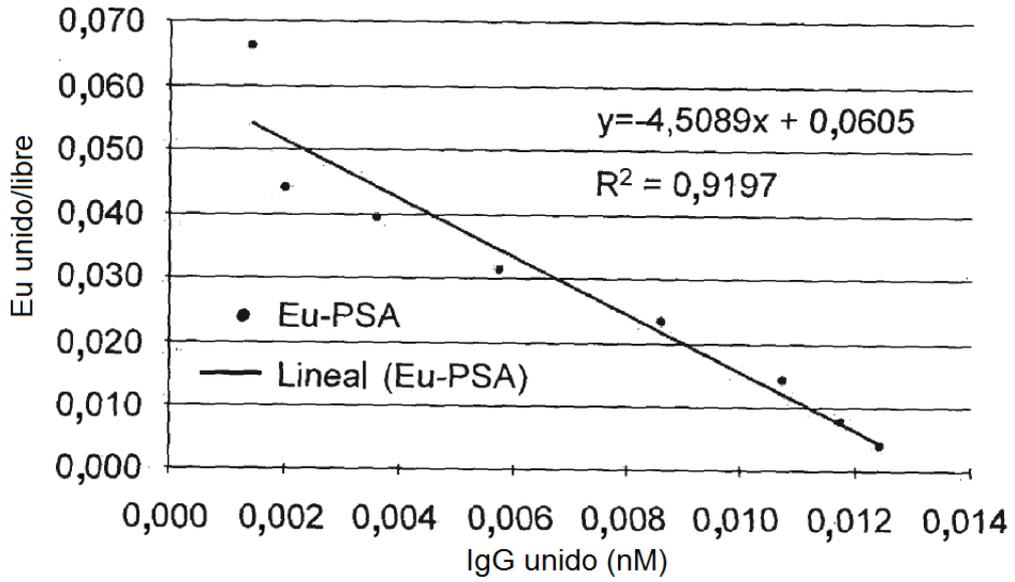
FIGURA 13

FIGURA 14

Péptido	CHSA <u>C</u> SKHCFVYC (VI-21)			
	CHSA <u>C</u> SKHCFVHC (VI-15)			
	CKS MDGGW <u>T</u> C (VI-14)			
	CPS VDDGGW <u>T</u> C (VI-13)			
PSA	1 11 21 31 41			
	IVGWECEKH SQPWQVLVAS RGRAVCGGVL VHPQWVLTAA H CIRNKSVIL			
Péptido	51 61 71 81 91	CGPG ID <u>S</u> WVC (III-8)		
PSA	LGRHSLFHPE DTGQVFQVSH SFPHPLYD <u>M</u> S LLKNRFLRPG DDSS <u>H</u> DLMLL			
Péptido		CTWH <u>S</u> PEE C (VI-18)		
		CPAD <u>F</u> E <u>E</u> LC (VI-12)		
PSA	101 111 121 131 141			
	RLSEPAELTD AVKVMIDLPTQ EPALGTT <u>C</u> YA SGWGSIEPEE FLTPK <u>K</u> LQCV			
Péptido		CHPYKVGC (I-16)	CDY M <u>P</u> LVD <u>N</u> C (III-12)	
	151 161 171 181 191			
PSA	DLHVISNDVC AQVHPQKVTK FMLCAGRWTG GKSTC <u>S</u> GD <u>S</u> G GPLVCNGVLQ			
Péptido	CK <u>S</u> WG <u>S</u> SR <u>C</u> (I-9)			
	201 211 221 231			
PSA	GITSWGSEPC ALPERPSLYT KVVHYRKKWIK DTIVANP			

FIGURA 15

(A) Representación de Scatchard, Fab 5A10 policlonal de cabra antihumano en recubrimiento, gen A Muestra: 5A10-Fab 15 ng/pocillo



(B)

Curva de valoración, 5A10-Fab, gen A

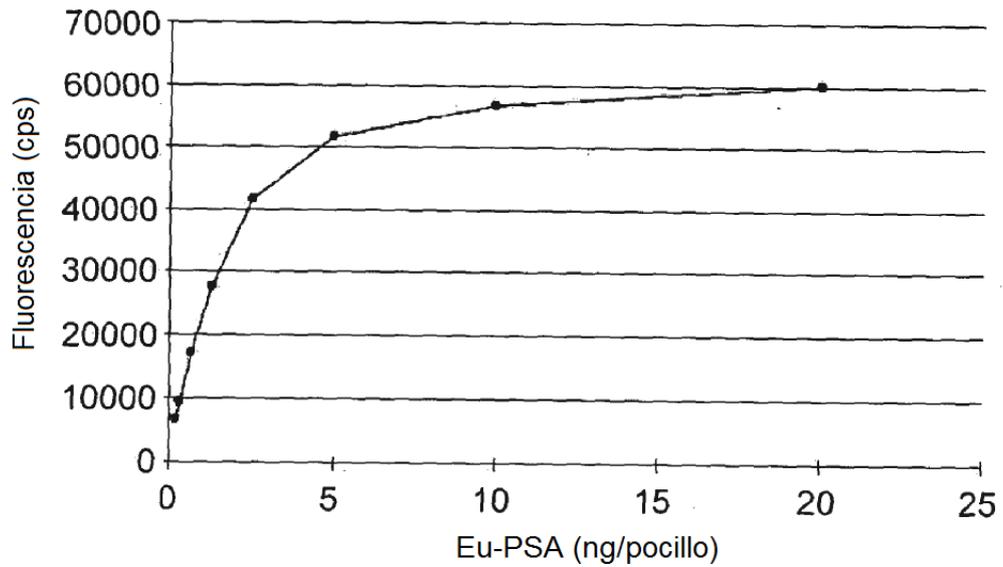


FIGURA 16

Cinética de marcaje de ^{177}Lu -DTPA-m11B6 a 25 °C

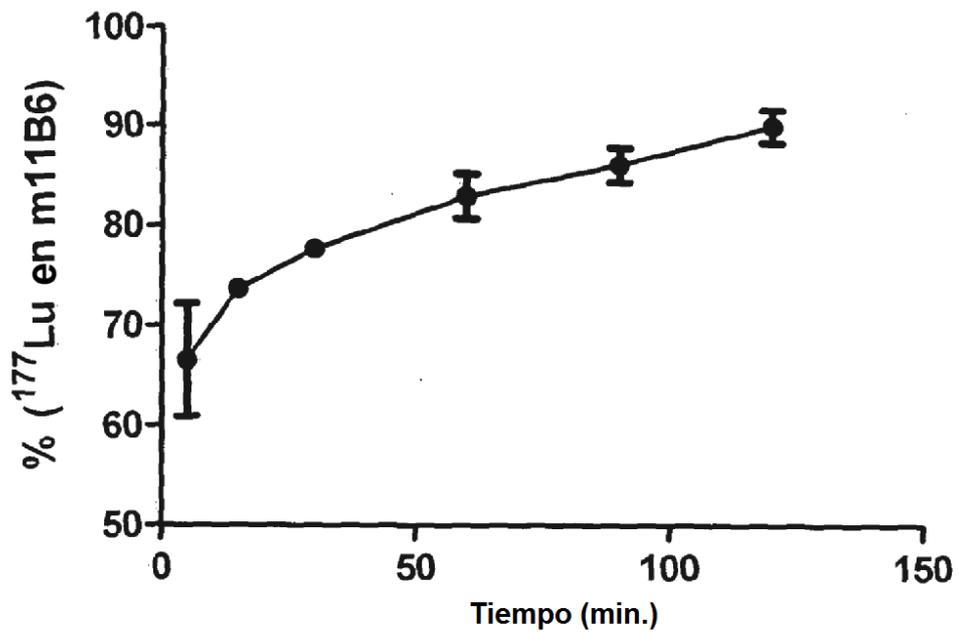


FIGURA 17

Estabilidad *in vitro* de ^{177}Lu -DTPA-11B6

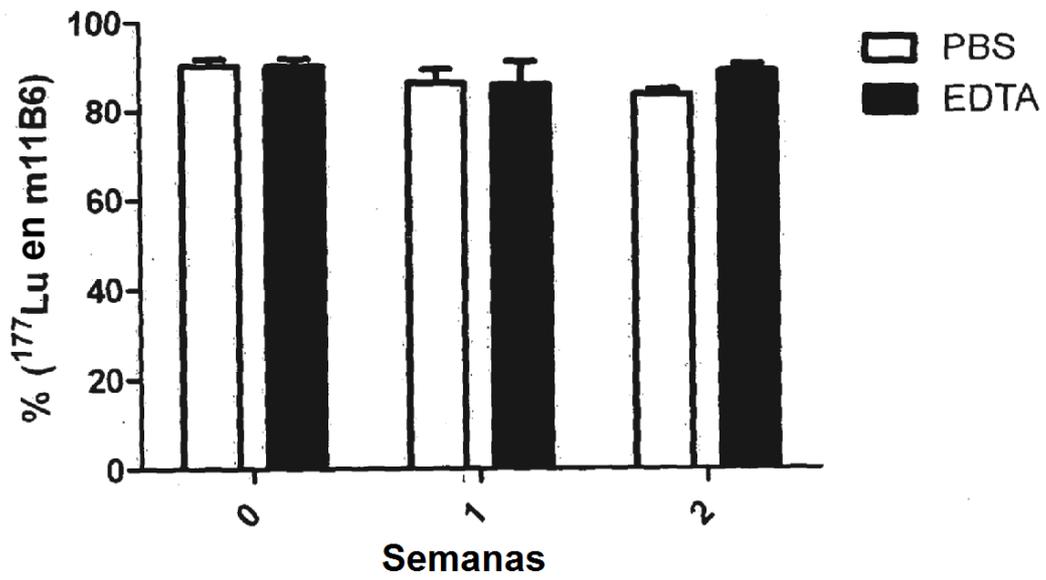


FIGURA 18

Columna 1 | Columna 2 | Columna 3 | Columna 4

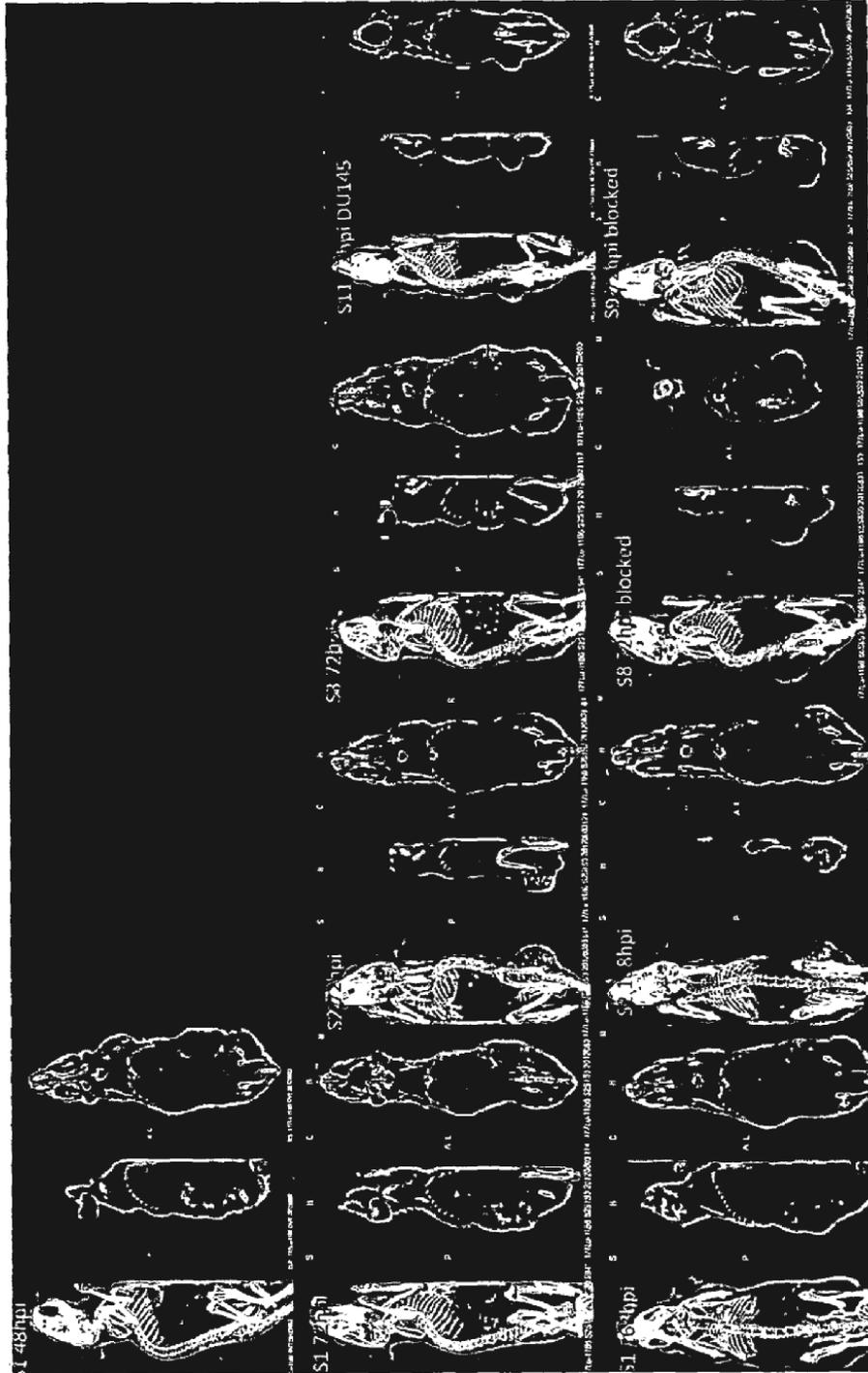


FIGURA 19

Biodist. de $^{177}\text{Lu-DTPA-m11B6}$ en ratones con NMRI desnudos con xenoinjertos de LNCaP

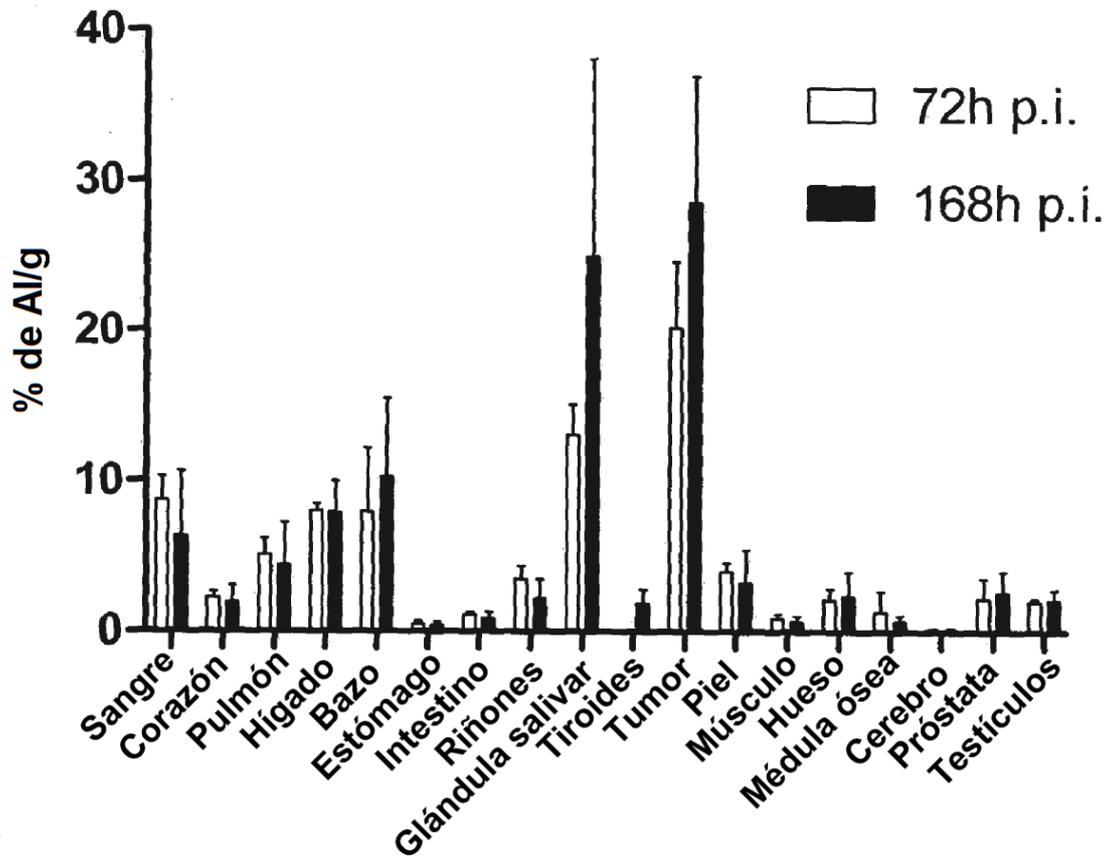


FIGURA 20

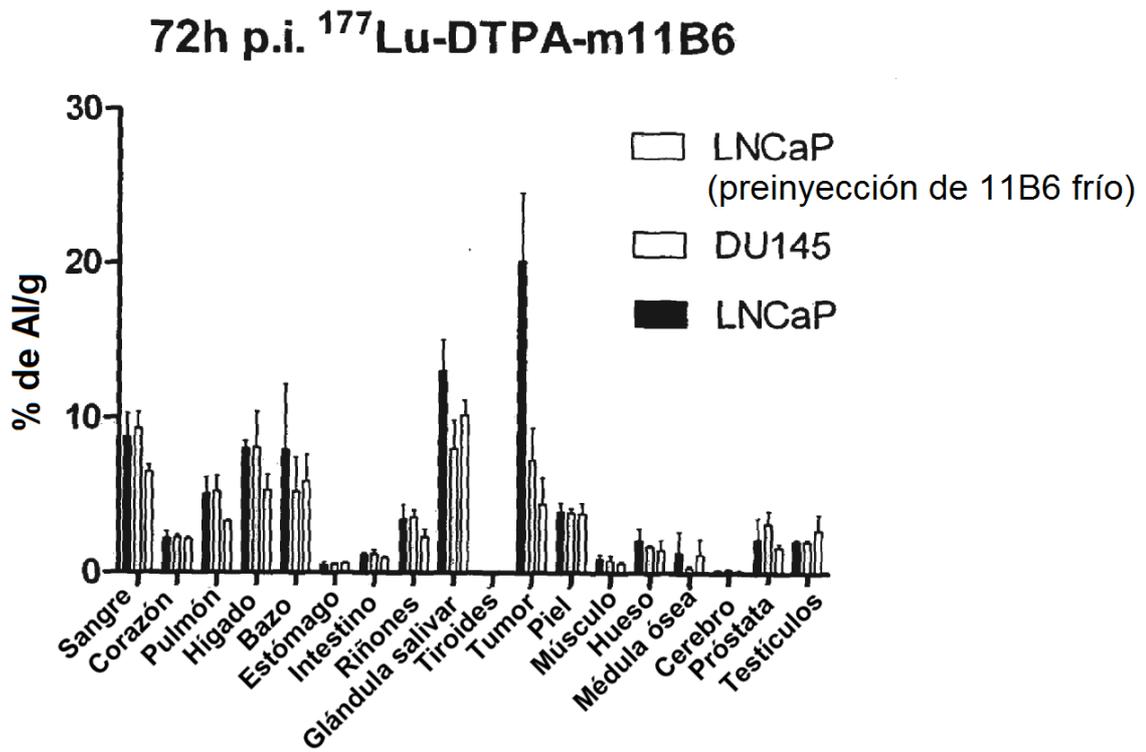


FIGURA 21

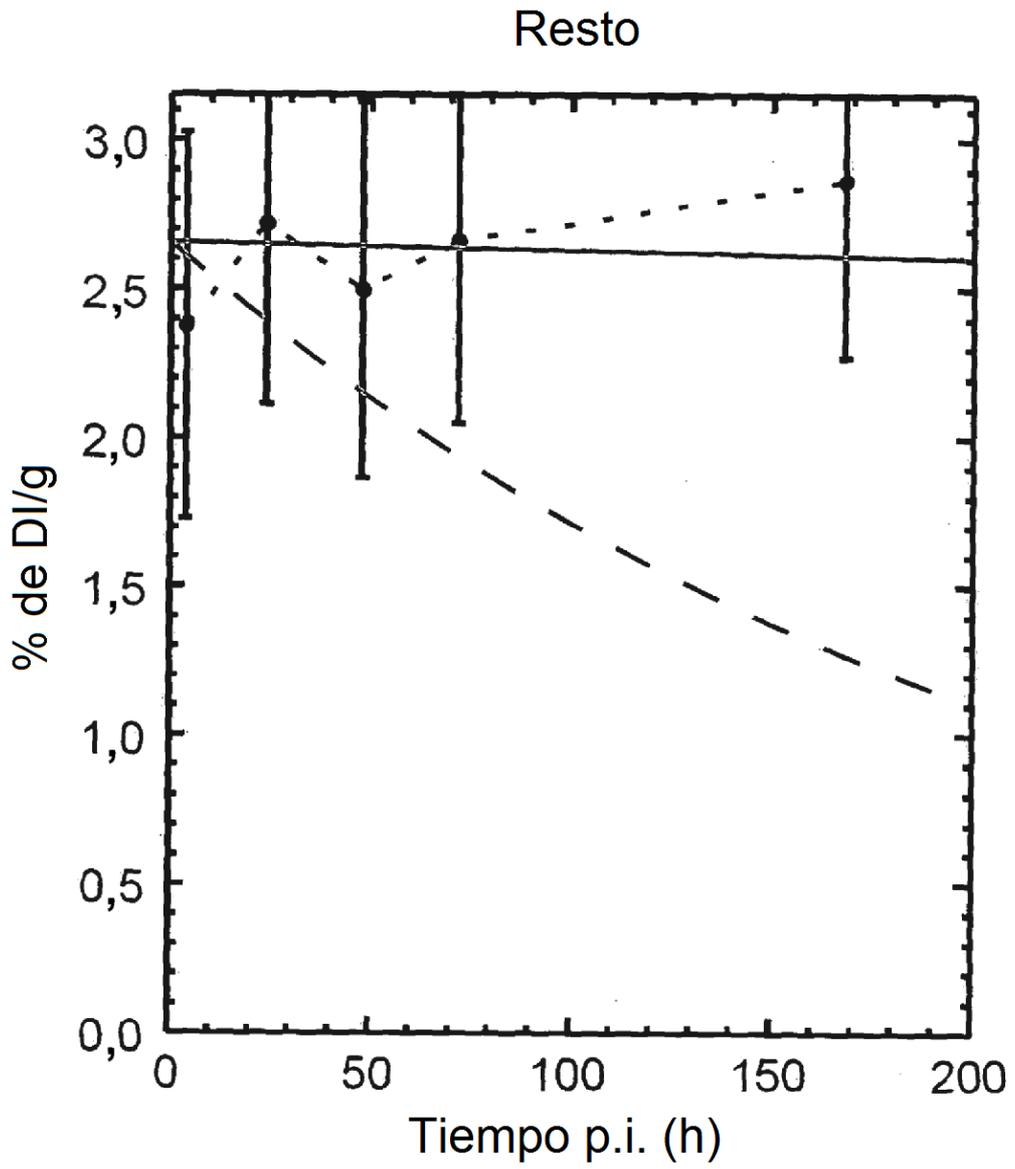


FIGURA 21 (continuación)

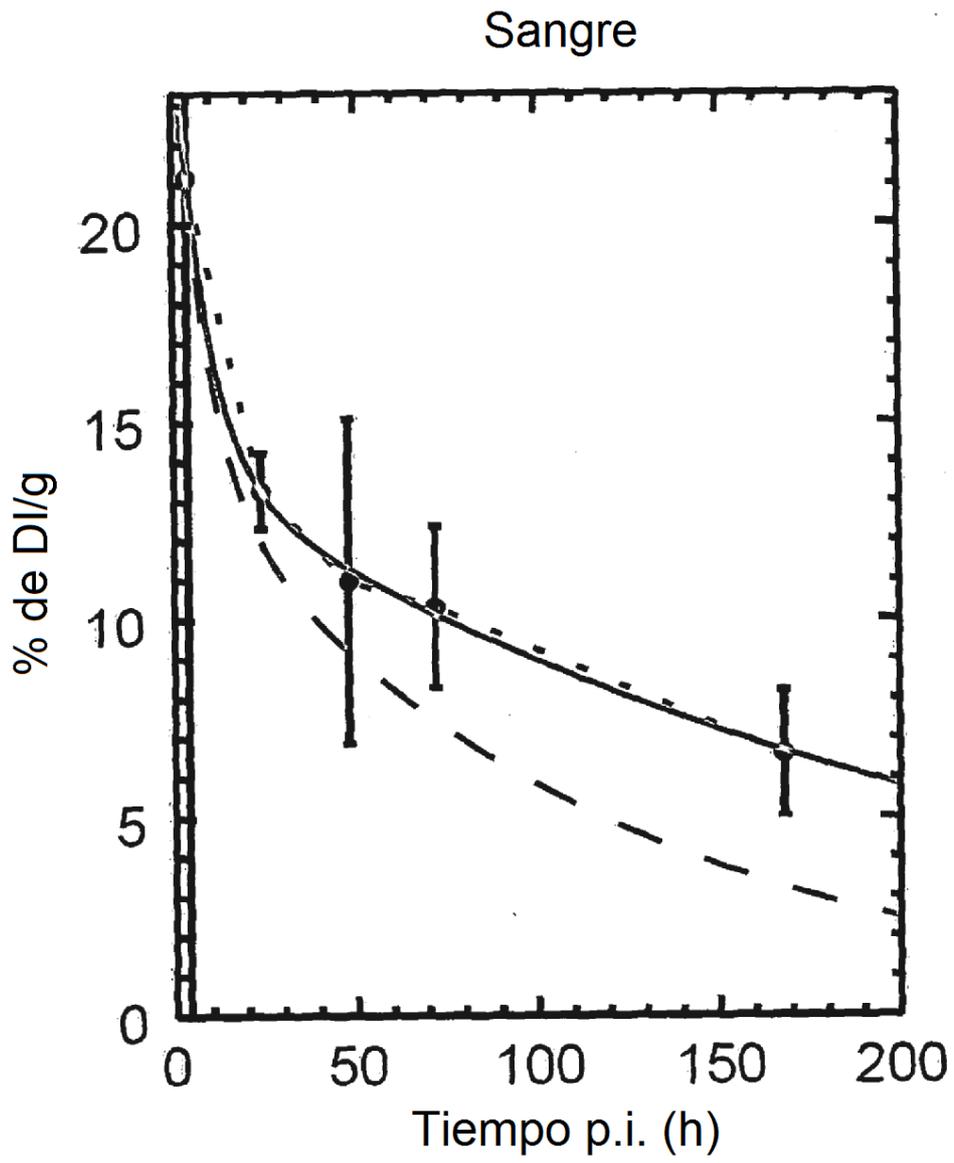


FIGURA 21 (continuación)

Corazón

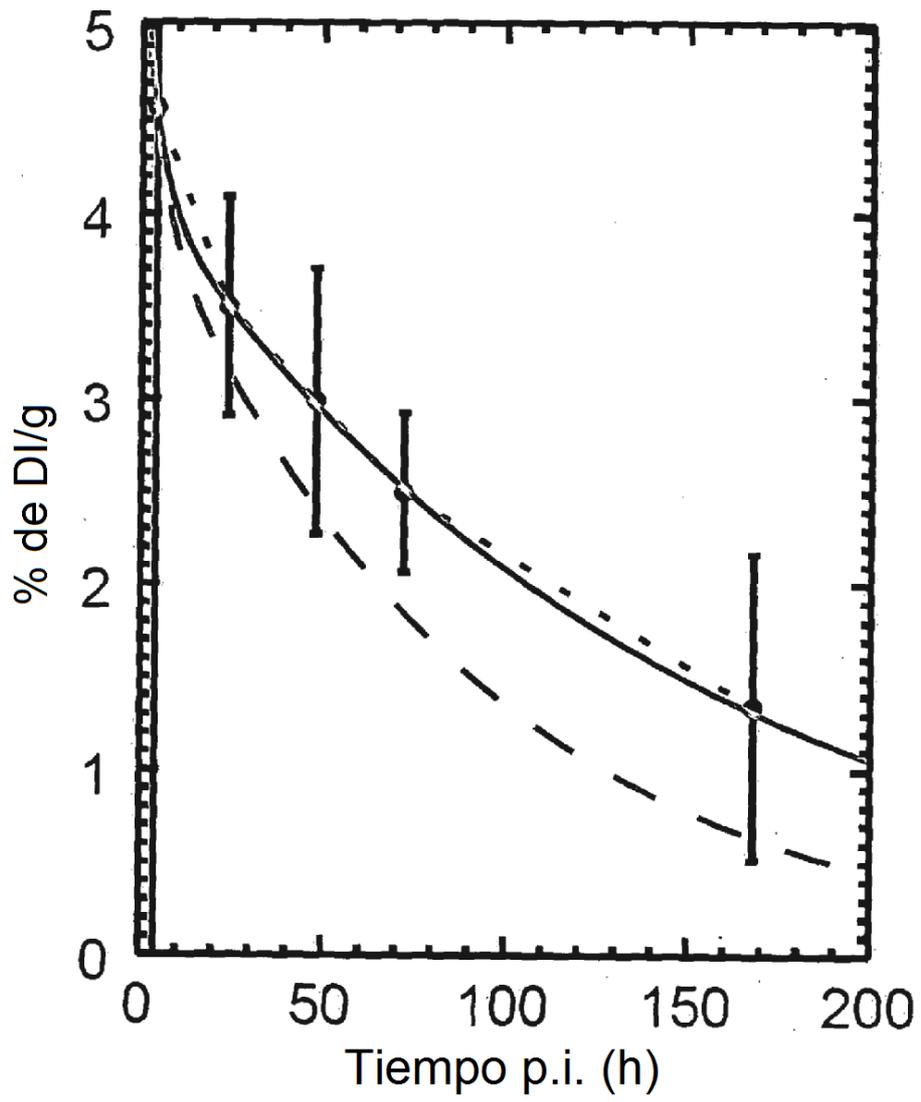


FIGURA 21 (continuación)

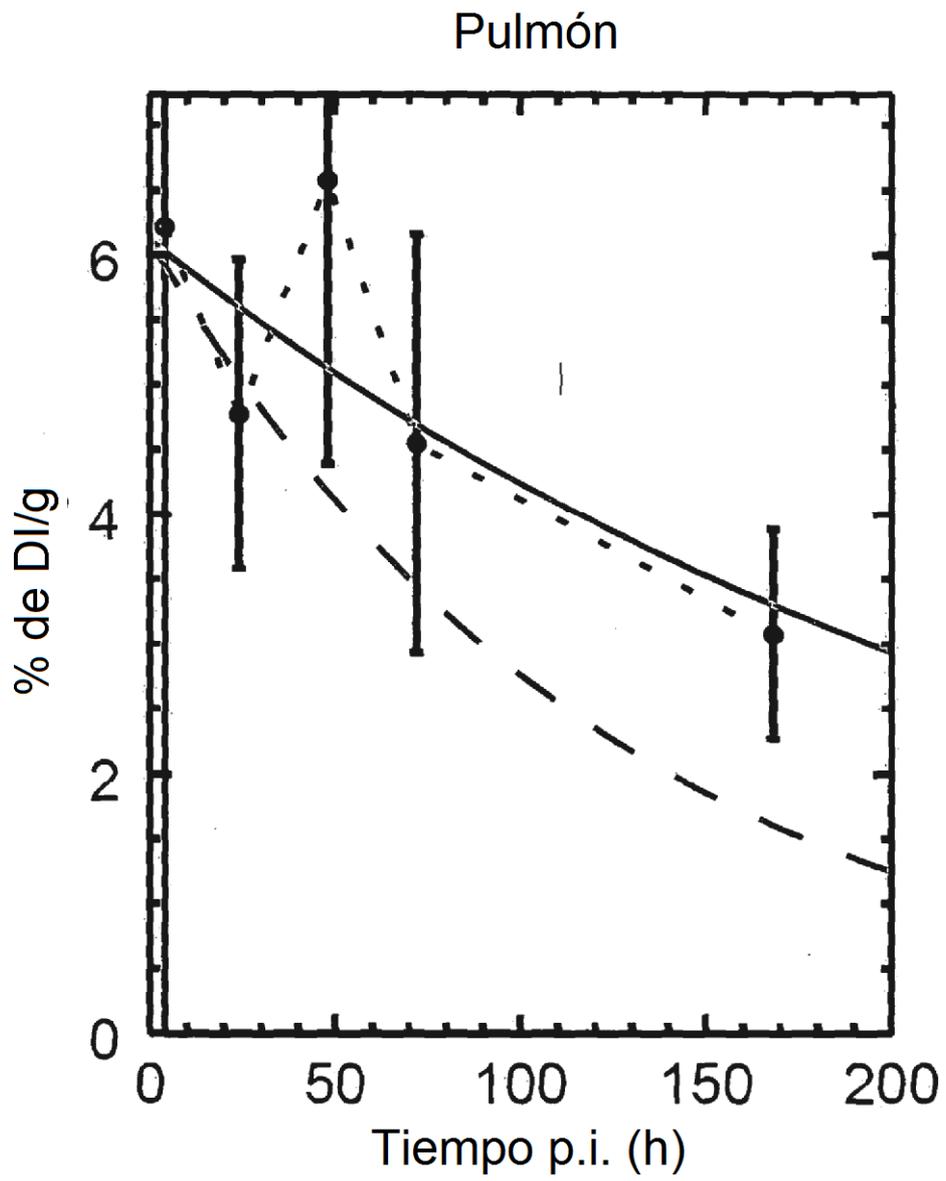


FIGURA 21 (continuación)

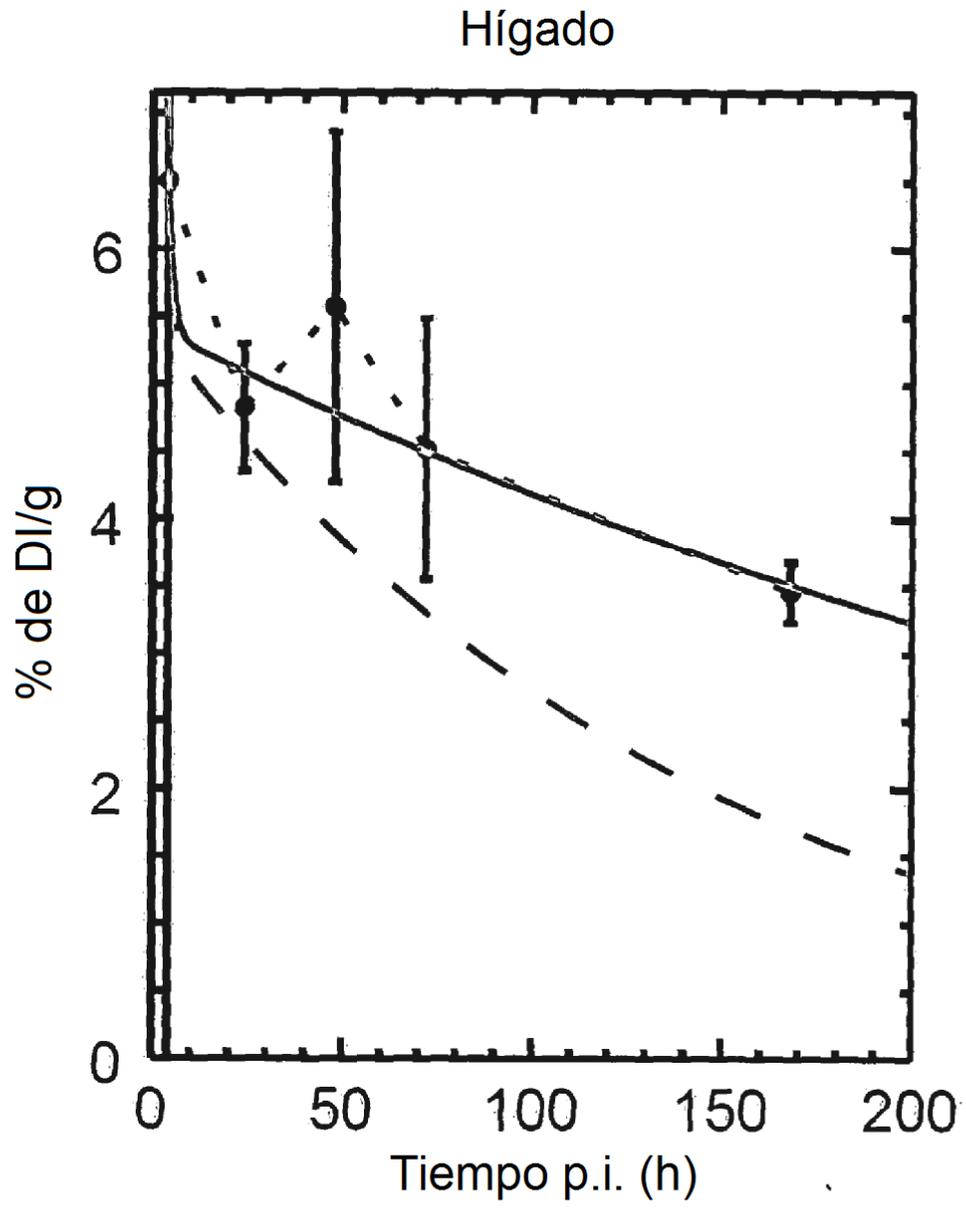


FIGURA 21 (continuación)

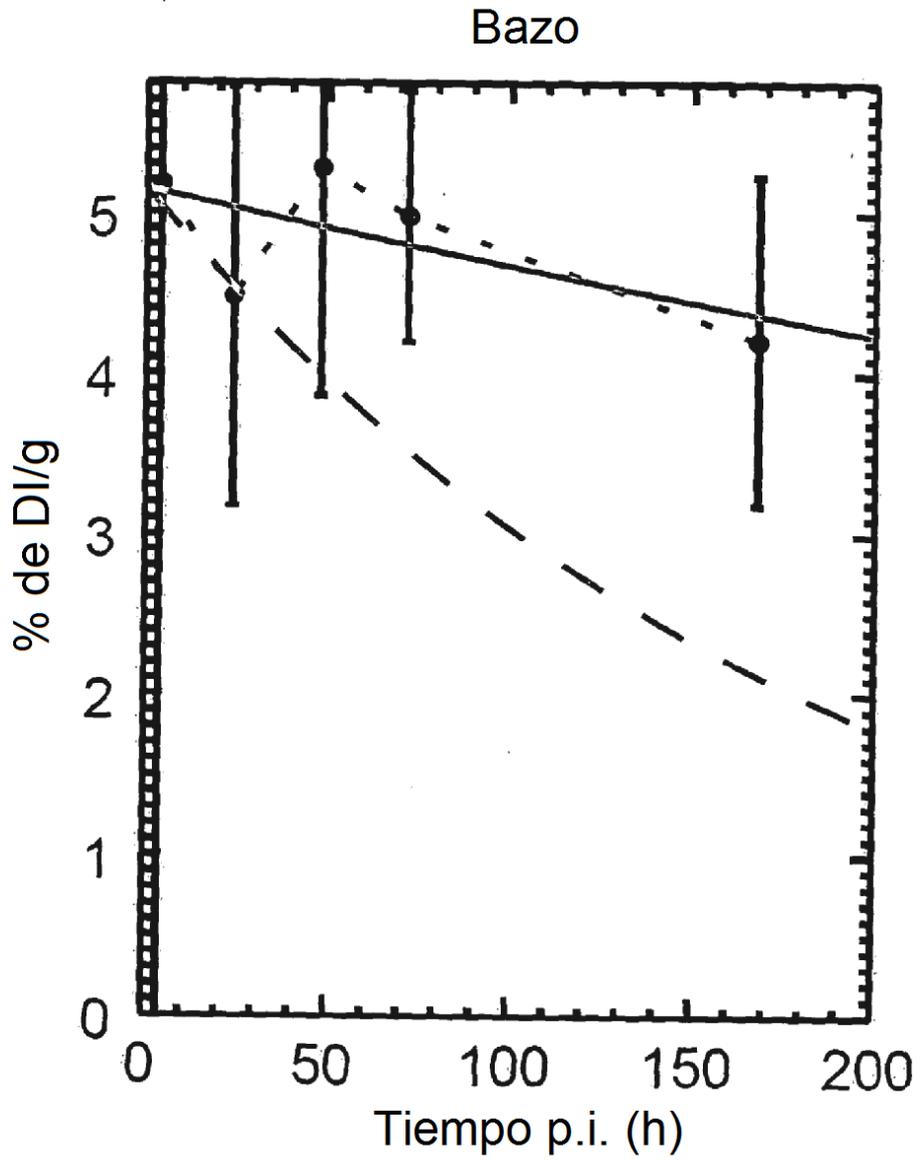


FIGURA 21 (continuación)

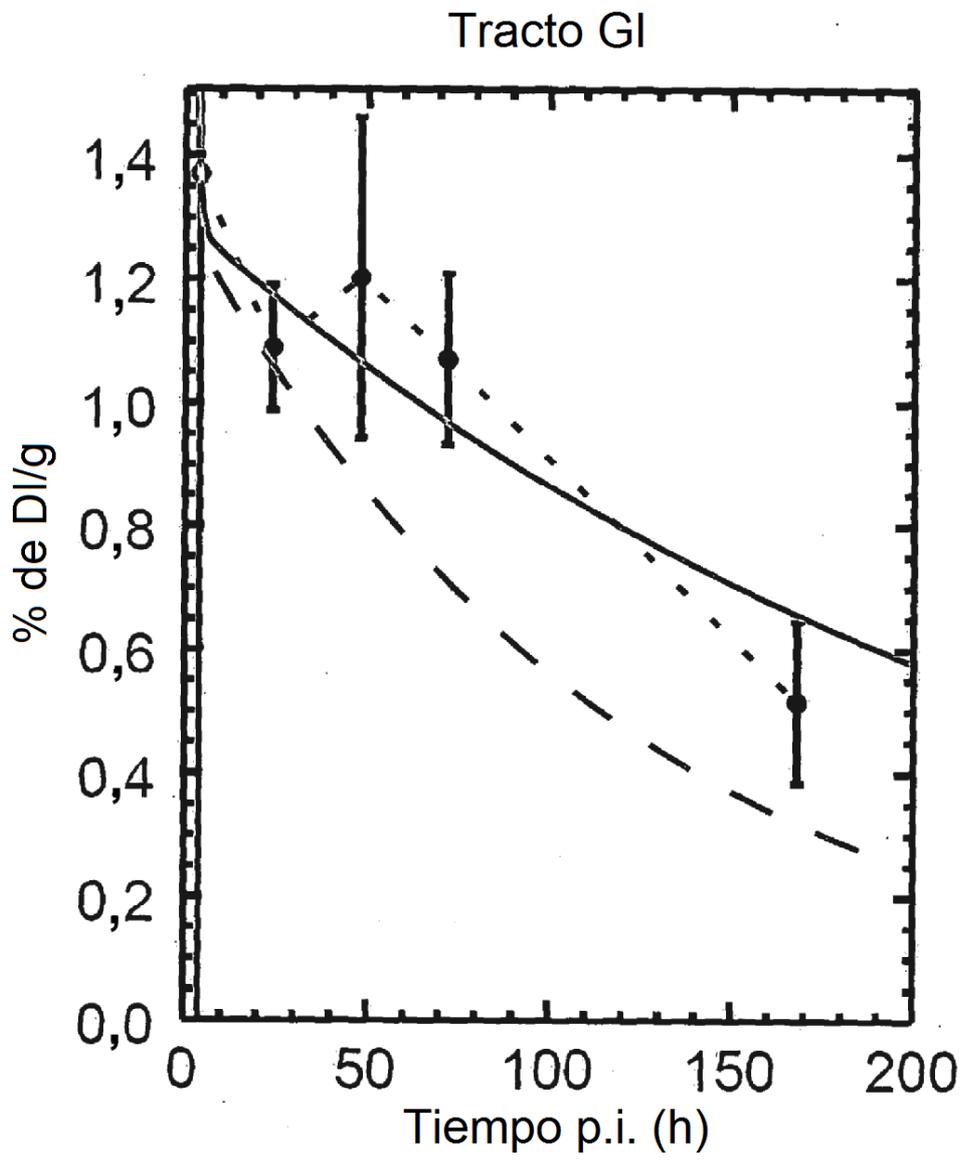


FIGURA 21 (continuación)

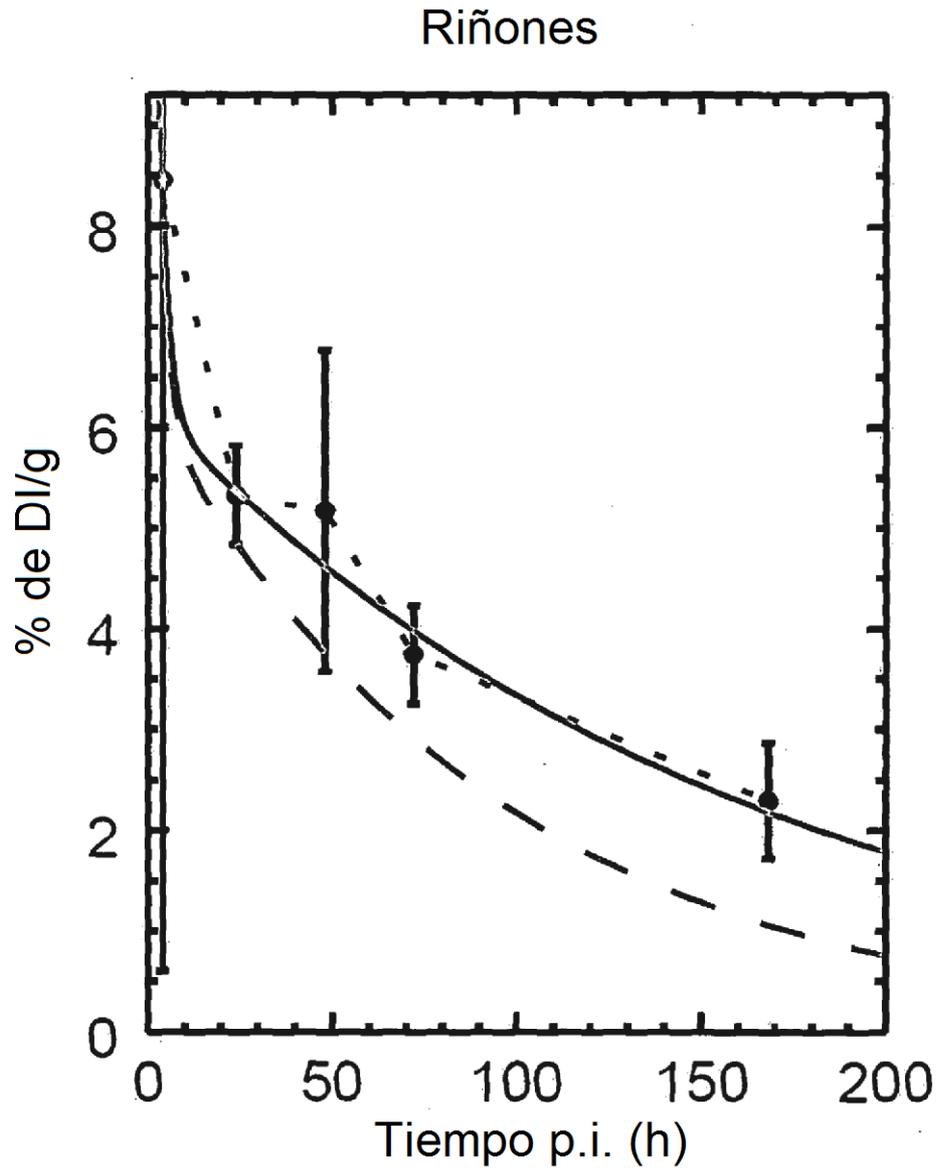


FIGURA 21 (continuación)

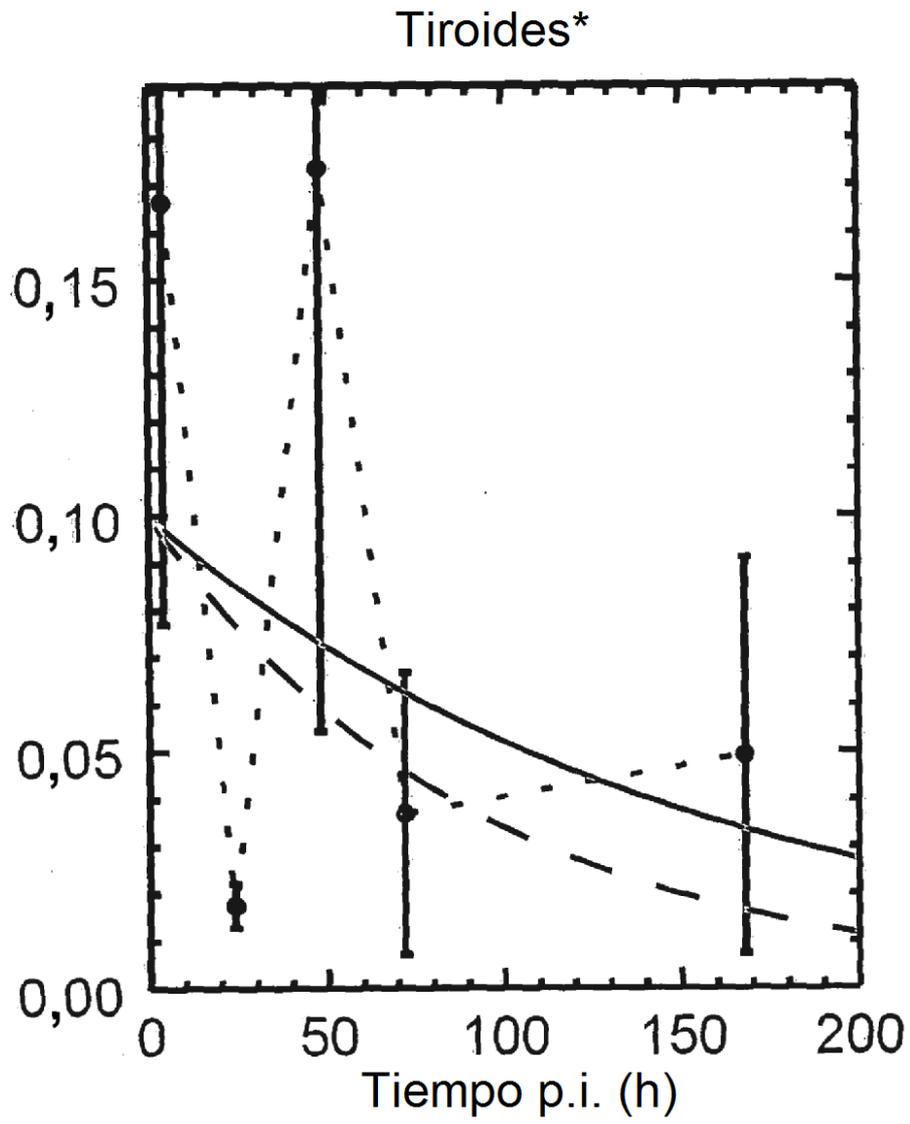


FIGURA 21 (continuación)

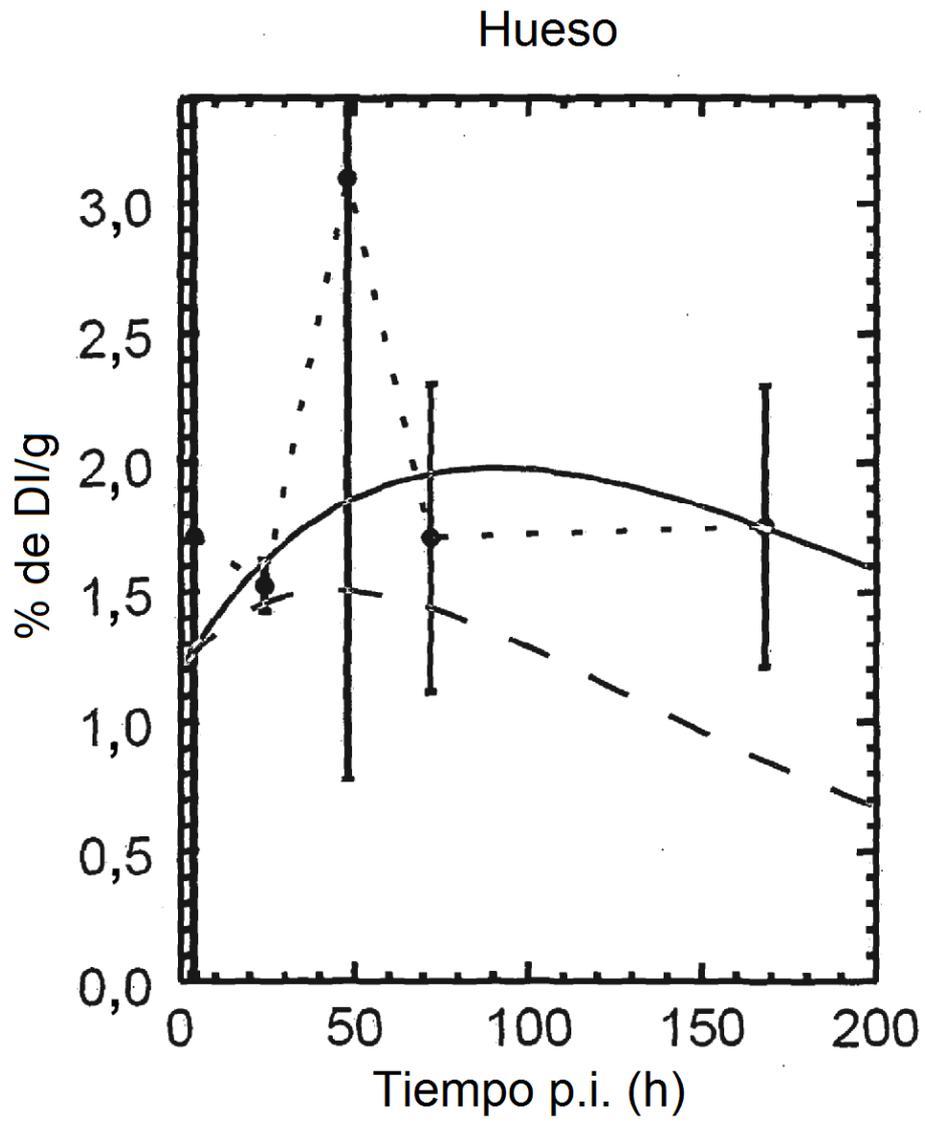


FIGURA 21 (continuación)

Cerebro

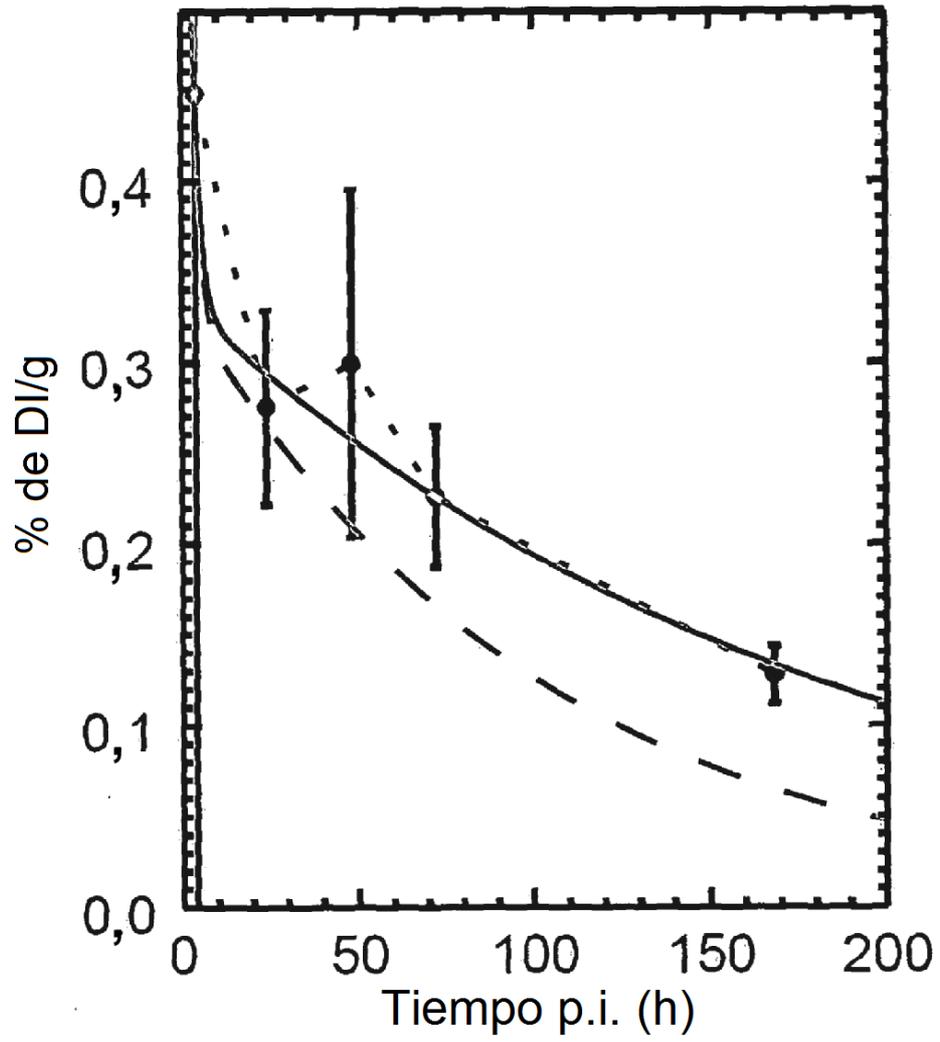


FIGURA 21 (continuación)

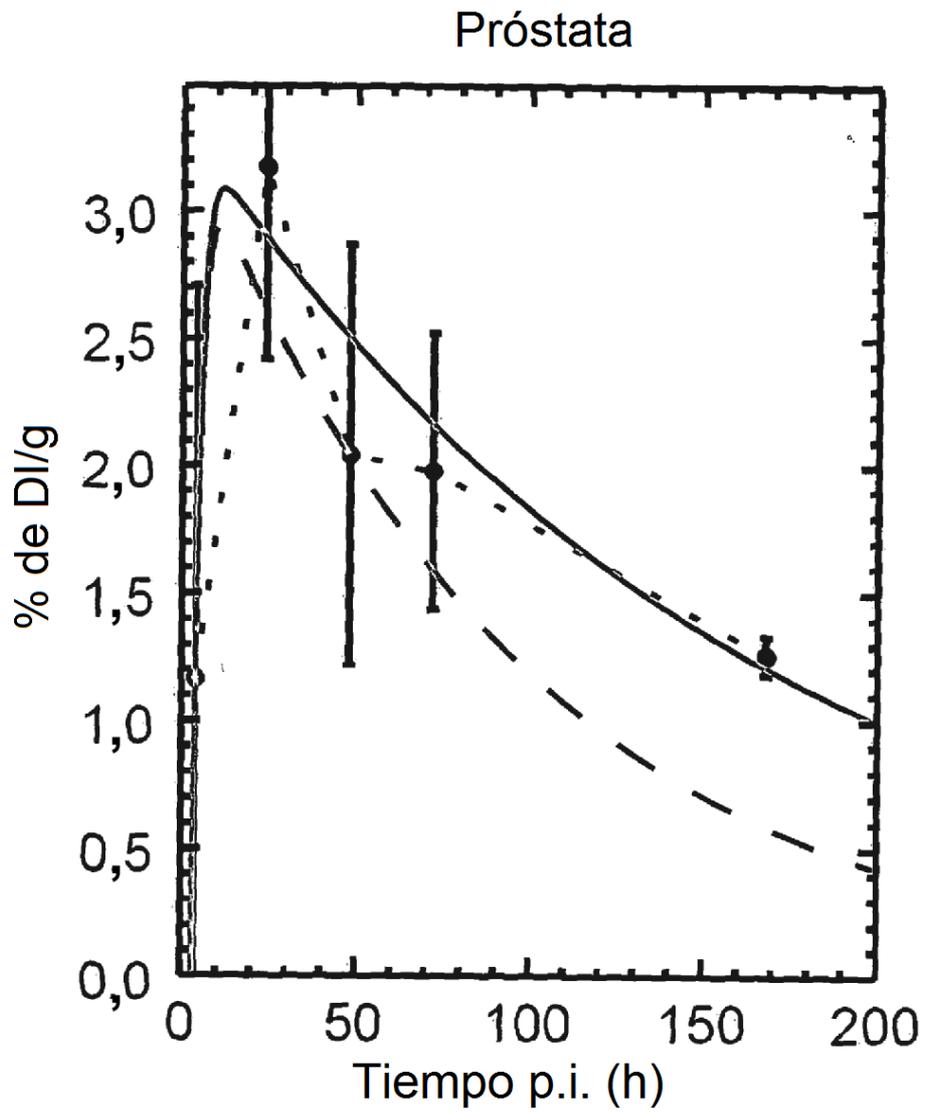


FIGURA 21 (continuación)

Testículos

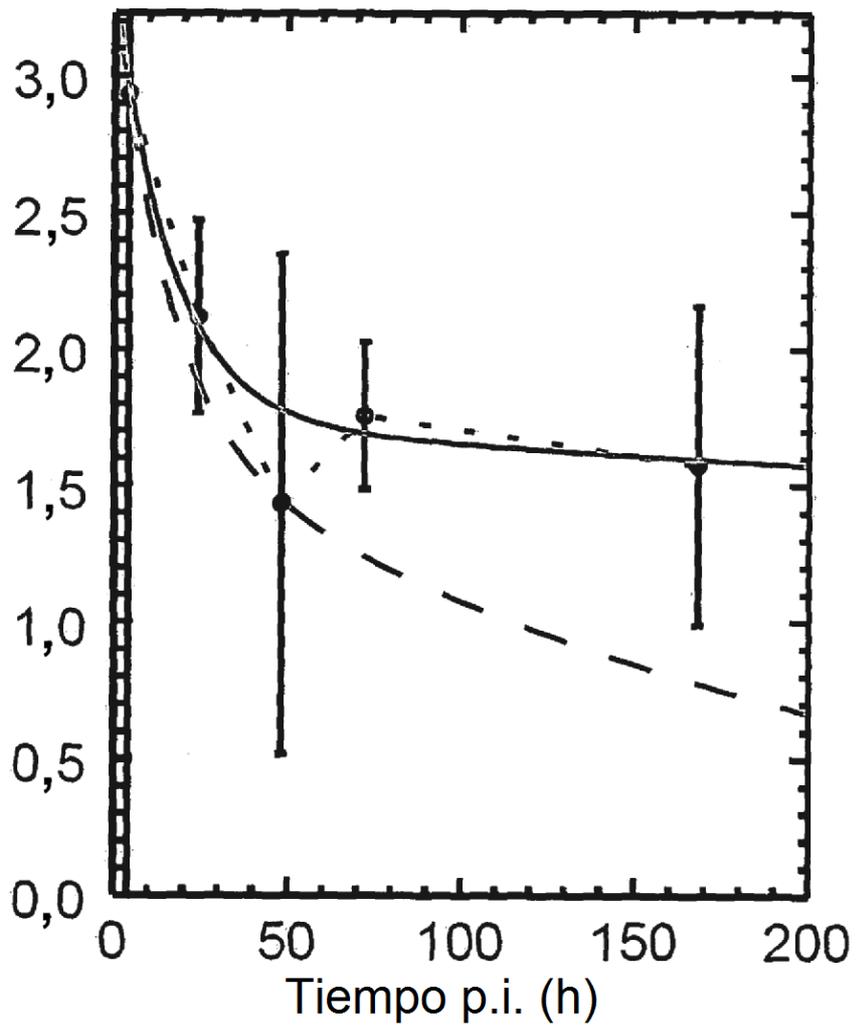


FIGURA 21 (continuación)

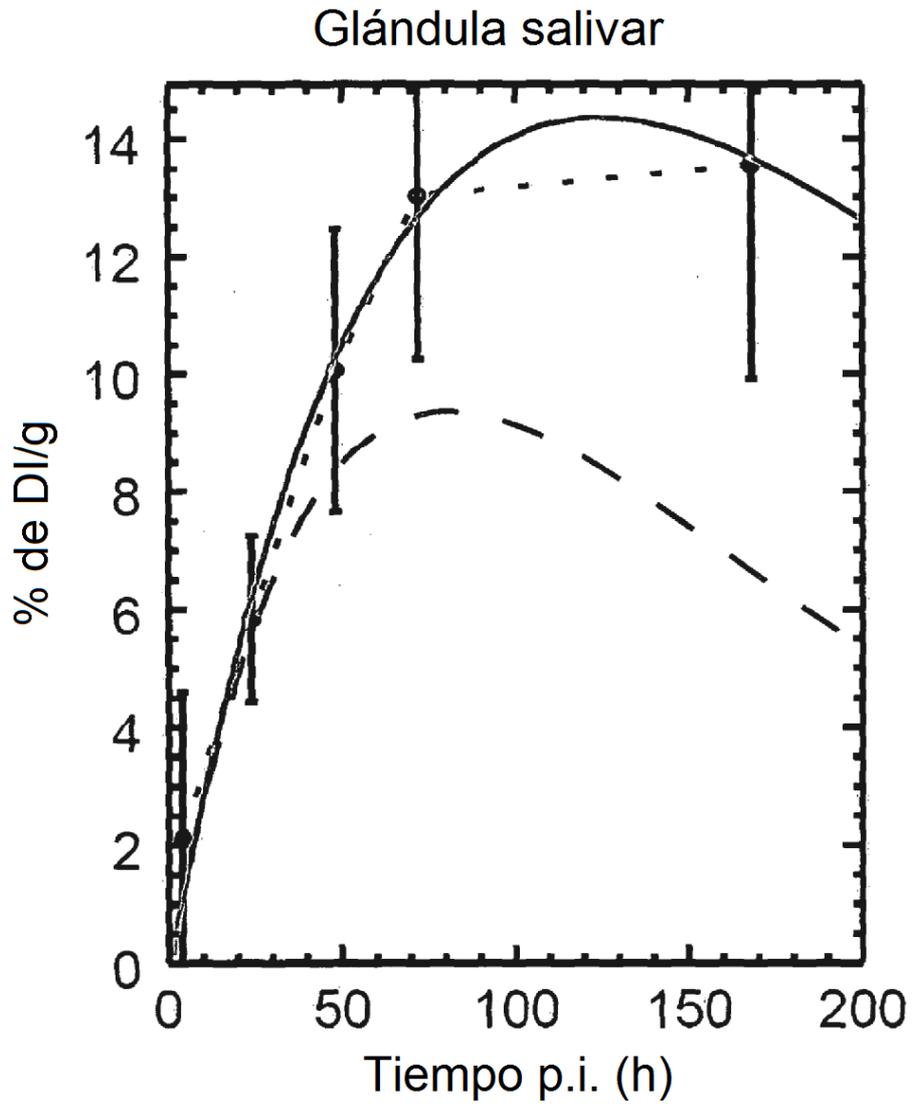


FIGURA 21 (continuación)

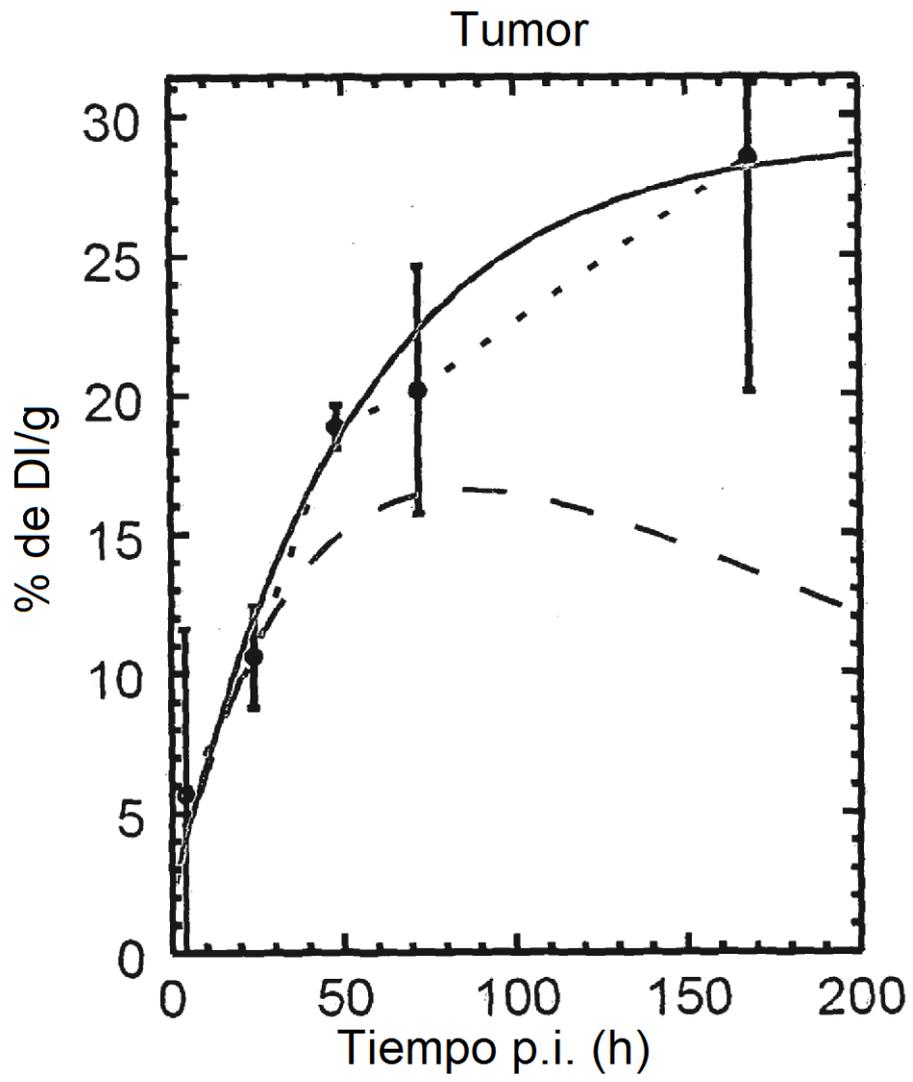


FIGURA 21 (continuación)

Médula ósea

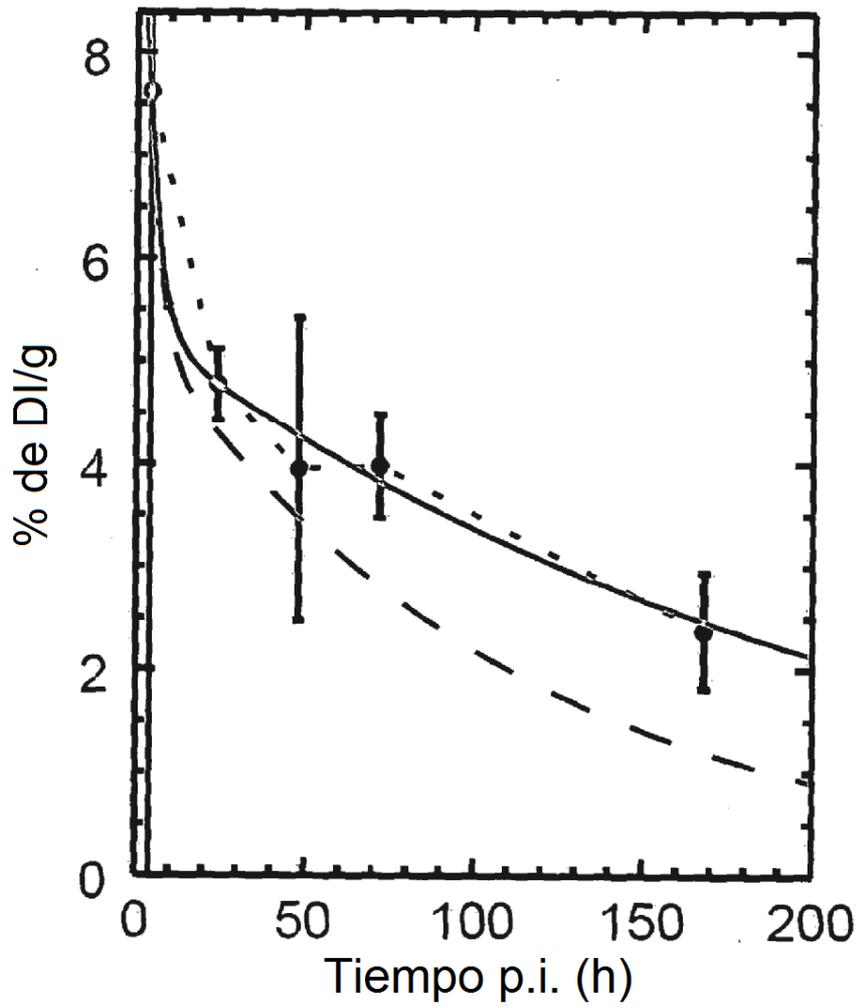


FIGURA 21 (continuación)

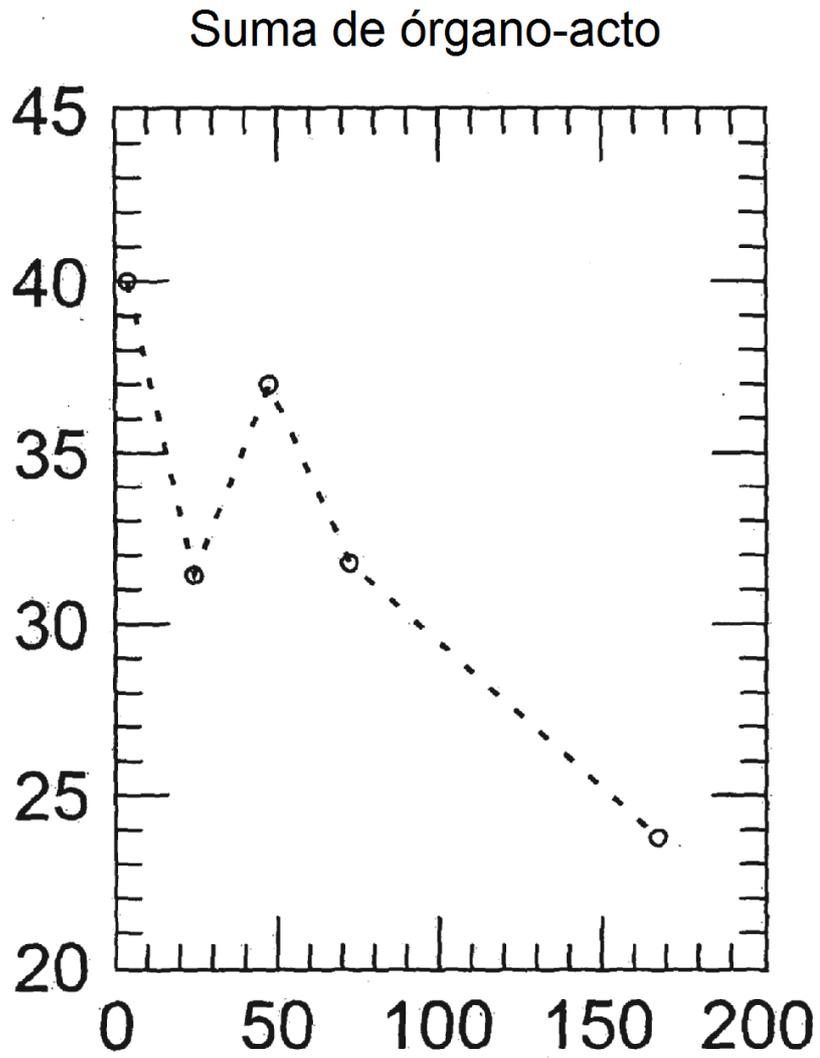


FIGURA 21 (continuación)

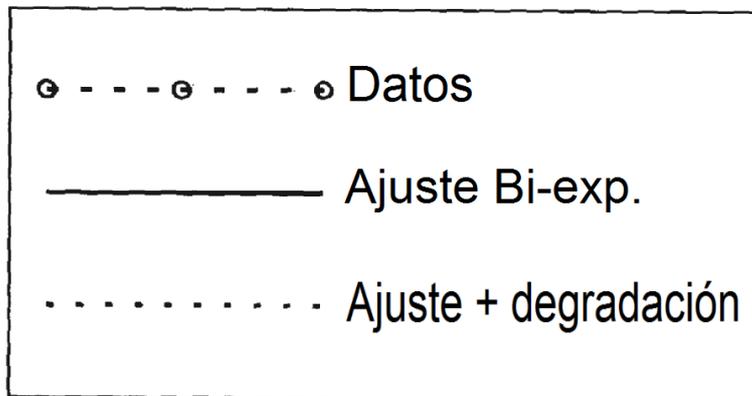


FIGURA 22



FIGURA 23 (A)

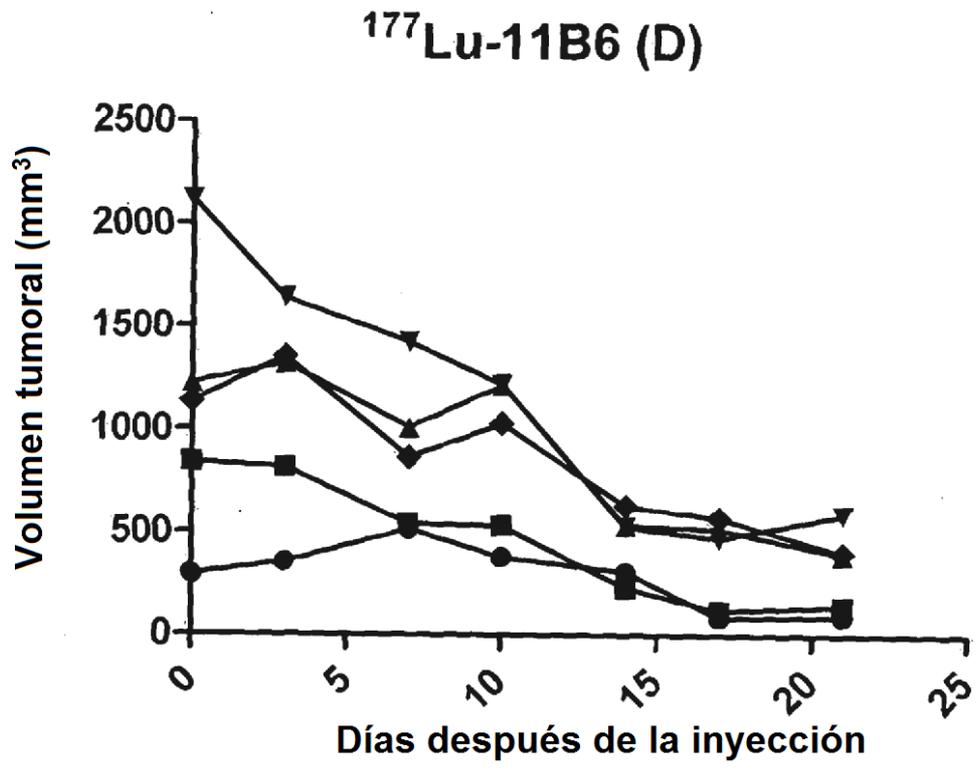


FIGURA 23 (B)

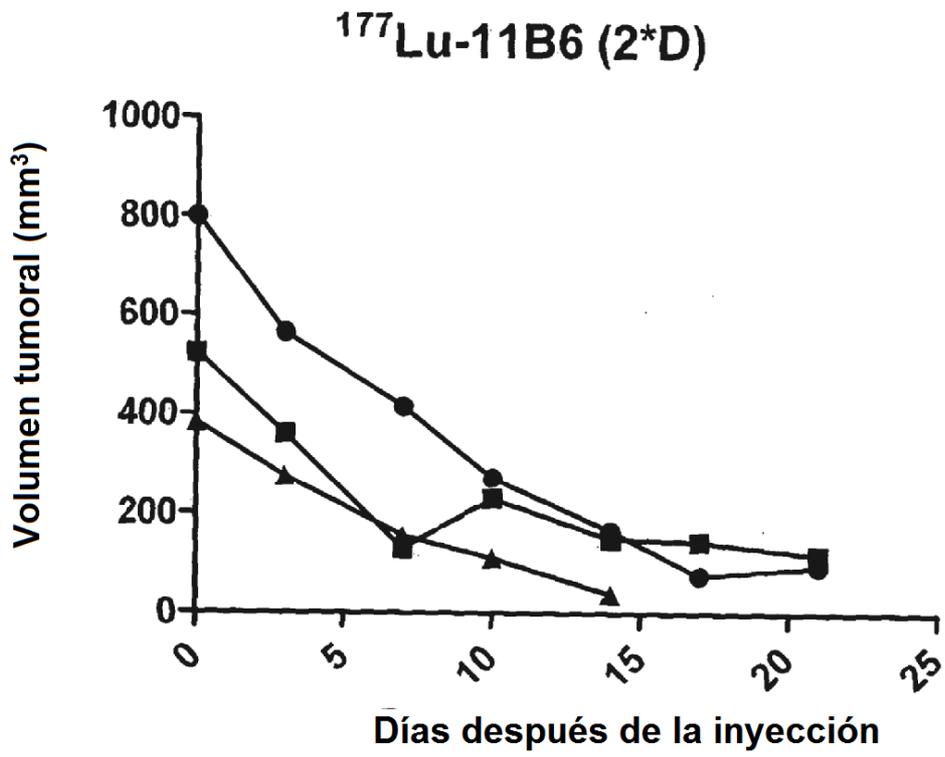
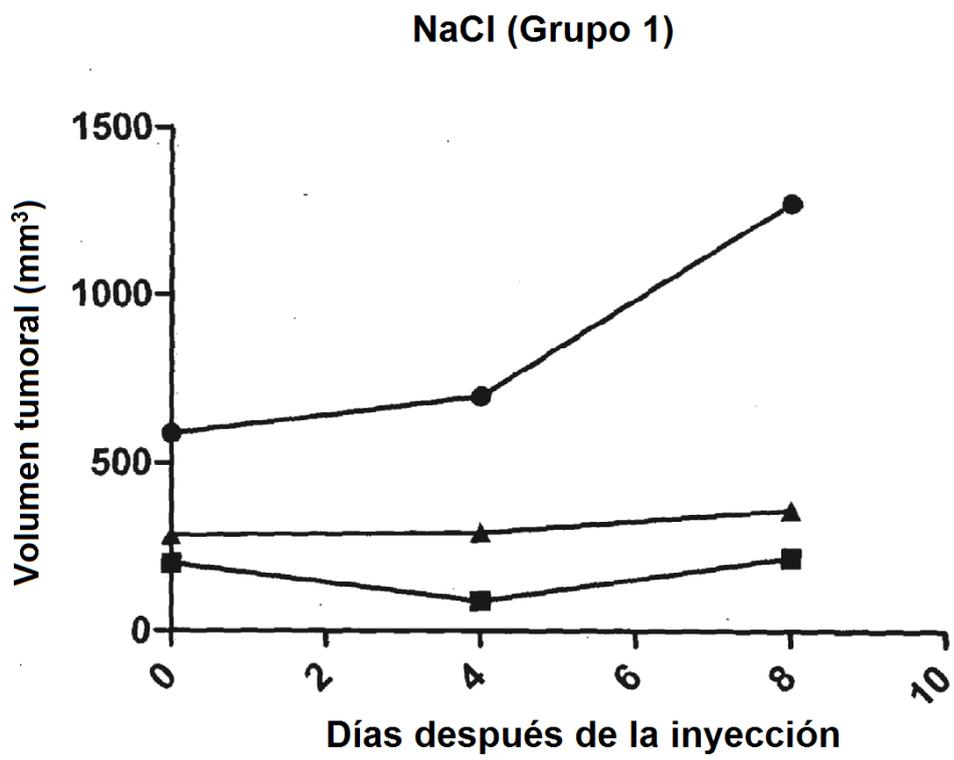
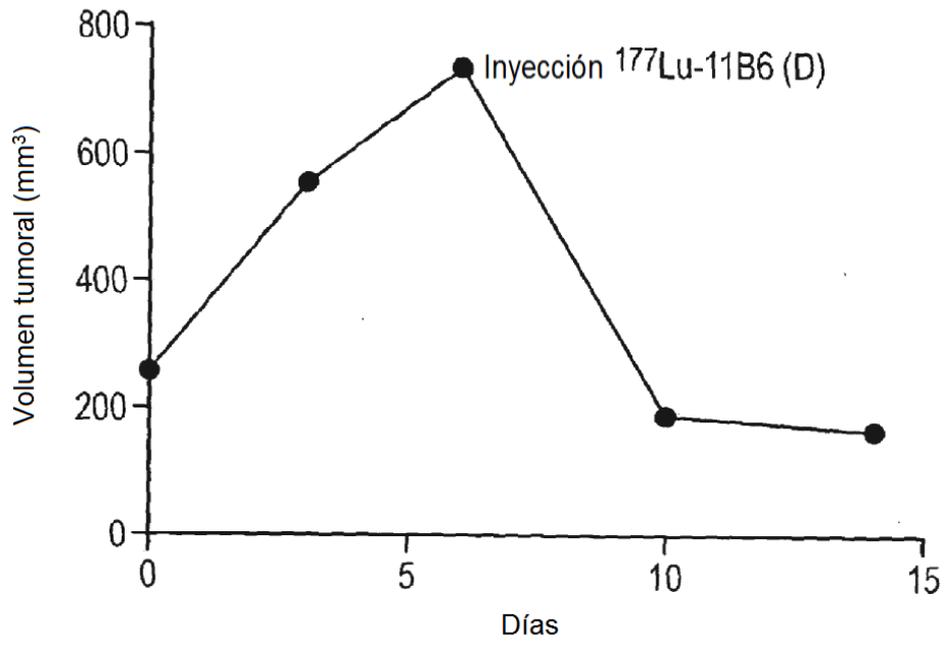


FIGURA 23 (C)



(A)



(B)

