

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 964**

51 Int. Cl.:

A61K 51/10 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2014 PCT/EP2014/061824**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195460**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2014 E 14728576 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 3003402**

54 Título: **Terapia de combinación que comprende rituximab y el anticuerpo monoclonal HH1 radiomarcado**

30 Prioridad:
07.06.2013 DK 201370313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2018

73 Titular/es:
**NORDIC NANOVECTOR ASA (100.0%)
Kjelsåsveien 168B
0884 Oslo, NO**

72 Inventor/es:
**LARSEN, ROY H. y
REPETTO-LLAMAZARES, ADA**

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 662 964 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación que comprende rituximab y el anticuerpo monoclonal HH1 radiomarcado

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a radioinmunoconjugados que son capaces de sobrerregular la expresión de uno o más antígenos. Los antígenos sobrerregulados pueden ser los antígenos dirigidos por los radioinmunoconjugados o diferentes antígenos expresados en las mismas células.

10

Antecedentes de la invención

El uso de la terapia de anticuerpos monoclonales (MAT) ha sido un área de gran interés y fuertes esfuerzos de investigación. Para que sea eficaz, MAT depende de un número suficiente de antígenos por célula a los que los antígenos se pueden unir para desencadenar la respuesta (Sugimoto et al., 2009, Czuczman et al., 2008).

15

El uso de la radioinmunoterapia (RIT) ha sido aprobado como una opción terapéutica en la terapia contra el cáncer (Stevens et al., 2012). En la actualidad, la radioinmunoterapia se utiliza principalmente en aquellos pacientes que experimentan una recaída de la quimioterapia y / o MAT (Stevens et al., 2012).

20

Se sabe de la bibliografía que la irradiación de haz externo con una tasa de dosis alta puede provocar un aumento de CD20 en células B y que esta respuesta fue inhibida por antioxidantes como ácido ascórbico, PEG-catalasa, etc. y potenciada por agentes de oxidación como H₂O₂ y butionina sulfoximina (Kunala et al., 2001; Gupta et al., 2008). Es de destacar que el efecto duraba solo unas cuarenta y ocho horas después de la exposición al haz externo.

25

Sin embargo, no se sabía si la radioinmunoterapia a dosis bajas podría sobrerregular la expresión del antígeno. De hecho, Elgstrøm et al. (2012) encontraron una reducción en la expresión del antígeno después de la radioinmunoterapia experimental.

30

Además, la terapia con anticuerpos monoclonales puede causar una expresión reducida del antígeno en las células tumorales (Musto et al., 2011) así como también anticuerpos combinados con quimioterapia (Hiraga et al., 2009).

35

Por lo tanto, es conocido en el campo que la irradiación de dosis alta con haz externo puede provocar una expresión de antígeno aumentada y que la terapia con radioinmunoterapia y anticuerpo monoclonal puede provocar una expresión de antígeno reducida en células cancerosas.

40

El presente estándar de administración de radioinmunoterapia como un tratamiento de reducción, por ejemplo, rituximab (el anticuerpo) se administra como un tratamiento de acondicionamiento antes de Zevalin (el radioinmunoconjugado).

45

Un problema con este enfoque es que el trabajo experimental y los datos clínicos han indicado que la terapia de anticuerpos puede causar deriva de antígeno que es una presión de selección hacia células con baja expresión de antígeno, que se vuelven resistentes al tratamiento (Musto y D'Auria, 2011). Esto también se ha indicado en RIT experimental (Elgstrøm et al., 2012).

50

Por lo tanto, una opción terapéutica dirigida que podría causar lo contrario, es decir, un aumento de antígenos en las células tratadas, sería una herramienta terapéutica muy valiosa.

El documento WO 2011/092295 divulga un anticuerpo HH1 marcado con ¹⁷⁷LU para el tratamiento del linfoma no Hodgkin, la leucemia linfocítica crónica y tumores malignos de células B. El inmunoconjugado radiológico se puede administrar en combinación con o además de otra terapia, que incluye un anticuerpo anti-CD20.

55

El documento WO 2013/088363 divulga un radioinmunoconjugado que comprende un anticuerpo monoclonal que se dirige a CD37, un conector opcional y un radionucleido para tratar tumores malignos de células B.

Sumario de la invención

60

La presente descripción se refiere a radioinmunoconjugados que son capaces de sobrerregular la expresión de uno o más antígenos. Los antígenos sobrerregulados pueden ser los antígenos dirigidos por los radioinmunoconjugados, diferentes antígenos expresados en las mismas células o una combinación.

Esta expresión permite dirigir e inhibir específicamente las células cancerosas y las células del sistema inmune.

65

De este modo, un aspecto de la presente invención se refiere a una combinación de un radioinmunoconjugado

- que comprende, un anticuerpo monoclonal HH1 que se dirige a CD37, un conector opcional, un radionúclido de ¹⁷⁷Lu, y un anticuerpo anti-CD20 que es rituximab, para usar en el tratamiento de un tumor maligno de células B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica, en la que; el radioinmunoconjugado sobrerregula la expresión de antígeno de un antígeno expresado en la superficie de las células cancerosas de células B, - el antígeno sobrerregulado es CD20, - la sobrerregulación es seguida por la terapia con anticuerpos anti-CD20 en una sola administración o en un patrón de administración repetida, y la administración de anticuerpo anti-CD20 es desde al menos un día hasta 15 días después de la administración de radioinmunoconjugado.
- 5
- 10 En una realización de la presente descripción están uno o más antígenos sobrerregulados expresados en la superficie de células cancerosas de células B.
- En otra realización de la presente descripción la sobrerregulación se realiza antes de la inmunoterapia o terapia inmunoconjugada en un paciente que padece cáncer.
- 15
- En una realización adicional de la presente invención, el paciente padece un tumor maligno de células B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica.
- Aún en otra realización de la presente invención, el anticuerpo monoclonal radiomarcado es HH1.
- 20
- En una realización de la presente invención, el conector es un conector quelante seleccionado del grupo que consiste en p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-éster, p-SCN-Bn-DTPA y CHX-Aⁿ-DTPA.
- En otra realización de la presente descripción, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹⁷mSn, ¹³¹I, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁵Dy, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁴Ra, ²²⁵Ac, y ²²⁷Th.
- 25
- En una realización adicional de la presente descripción el antígeno sobrerregulado se selecciona del grupo que consiste en CD37, CD19, CD20, CD21, CD22, HLA-DR, CD23, CD39, CD52, CDw75 y CD80.
- 30
- Aún en otra realización de la presente invención el radioinmunoconjugado se formula como una composición farmacéutica.
- En otra realización de la presente invención la composición farmacéutica comprende uno o más vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptable.
- 35
- En otra realización adicional de la presente invención se usa una terapia combinada en la que el radioinmunoconjugado es seguido por un tratamiento simultáneo o posterior con terapia de anticuerpos, terapia inmunoconjugada o una combinación de los mismos.
- 40
- En otra realización de la presente invención es el antígeno CD20 sobrerregulado, y la sobrerregulación es seguida por la terapia con anticuerpo anti-CD20 con rituximab en una sola administración o en un patrón de administración repetida.
- 45
- Aún en otra realización de la presente invención, el tratamiento simultáneo o posterior se dirige a un antígeno diferente del radioinmunoconjugado.
- Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un método para sobrerregular la expresión de antígeno que comprende la administración de un radioinmunoconjugado a una persona en la que sería ventajosa una sobreexpresión de antígeno sobrerregulada.
- 50
- En una realización de la presente invención, la persona padece una malignidad de células B.
- En otra realización de la presente invención se usa una terapia combinada en la que el radioinmunoconjugado es seguido por un tratamiento simultáneo o posterior con terapia de anticuerpos, terapia inmunoconjugada o una combinación de los mismos.
- 55
- En otra realización la terapia de radioinmunoterapia e inmunoterapia o inmunoconjugado se repite en varios ciclos.
- 60
- En otra realización, la radioinmunoterapia se administra como una dosis baja que, por sí misma, tiene un efecto de baja eliminación de células en tumores, pero tiene una sobrerregulación significativa del antígeno.
- Breve descripción de las figuras**
- 65
- La figura 1 muestra el aumento en la expresión de CD20 y CD37 para células Daudi después de 24 h de

incubación con betalutina (t = 0 después de la eliminación de betalutina además de medio nuevo), según se midió mediante citometría de flujo.

5 La figura 2 muestra la sobrerregulación de CD37 y CD20 para las células Daudi incubadas durante 1 hora y 24 horas con ¹⁷⁷Lu-tetulumab (betalutina), según se midió por citometría de flujo.

La figura 3 (Tabla 1) muestra el aumento de la expresión del antígeno después de 1 h de incubación con ¹⁷⁷Lu-tetulumab (betalutina), medida mediante citometría de flujo.

10 La figura 4 (Tabla 2) muestra la sobrerregulación de CD20 y CD37 para células tratadas con ¹⁷⁷Lu-rituximab (betalutina), medida por citometría de flujo.

15 La figura 5 (Tabla 3) muestra el % de aumento en la unión de ¹²⁵I-rituximab a células tumorales después de radioinmunoterapia vs control 4 días / 8 días / 11 días / 15 días después de añadir betalutina o control según se midió mediante el ensayo de unión a células.

La figura 6 muestra la biodistribución de ¹²⁵I-rituximab 3 días después de la inyección de ¹²⁵I-rituximab. Los ratones se habían inyectado 5 días antes con 350 MBq/kg de betalutina (tratado) o HH1 frío (control).

20 La presente invención se describirá más detalladamente a continuación.

Descripción detallada de la invención

25 Los presentes inventores se han encontrado de forma sorprendente al realizar experimentos con una tasa de dosis baja de anticuerpo HH1 marcado con ¹⁷⁷Lu de emisión beta (también denominado ¹⁷⁷Lu-tetulumab o betalutina) contra el antígeno CD37 asociado a las células B, de modo que las células tratadas con esto sobrerregularían la expresión de ambos CD37 y CD20, otro antígeno asociado a las células B.

30 Por lo tanto, se muestra que la terapia con ¹⁷⁷Lu-HH1 puede mejorar el estado de MAT en enfermedades de células B como cáncer y enfermedad autoinmune.

35 También fue un hallazgo inesperado que la radioinmunoterapia de baja tasa de dosis usando ¹⁷⁷Lu-HH-1 contra células positivas al antígeno CD37 no solo causó un aumento en la expresión del antígeno en las células cancerosas sino también un efecto prolongado en comparación con los datos publicados para la exposición al haz externo.

40 El tratamiento de radioinmunoterapia causó una mayor expresión de los antígenos CD37 y CD20. Esto implicaría que la radioinmunoterapia con, por ejemplo, ¹⁷⁷Lu-HH-1 podría usarse como un tratamiento de inducción para la terapia con anticuerpos, ya que la terapia con anticuerpos depende en gran medida de una buena expresión del antígeno.

45 Otro hallazgo digno de mención fue que la expresión del antígeno sobrerregulado podría durar entre una y dos semanas después de la exposición a la radioinmunoterapia frente a aproximadamente solo dos días después de la exposición al haz externo.

Se puede prever una nueva forma de utilizar la terapia de anticuerpos dirigida, es decir, terapia de inducción con radioinmunoterapia seguida de terapia con anticuerpos o conjugados de anticuerpos en los días y semanas siguientes para explotar la expresión aumentada del antígeno.

50 Por lo tanto, la presente descripción se refiere a radioinmunoconjugados que son capaces de sobrerregular la expresión de uno o más antígenos. Los antígenos sobrerregulados pueden ser los antígenos dirigidos por los radioinmunoconjugados, diferentes antígenos expresados en las mismas células o una combinación.

Esta expresión permite dirigir e inhibir específicamente las células cancerosas y las células del sistema inmune.

55 Usos de radioinmunoconjugados

60 De este modo, un aspecto de la presente invención se refiere a una combinación de un radioinmunoconjugado que comprende, un anticuerpo monoclonal HH1 que se dirige a CD37, un conector opcional, un radionúclido de ¹⁷⁷Lu, y un anticuerpo anti-CD20 que es rituximab, para usar en el tratamiento de un tumor maligno de células B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica, en la que; el radioinmunoconjugado sobrerregula la expresión antigénica de un antígeno expresado en la superficie de las células cancerosas de células B, el antígeno sobrerregulado es CD20, la sobrerregulación es seguida por la terapia con anticuerpos anti-CD20 en una sola administración o en un patrón de administración repetida, y la administración del anticuerpo anti-CD20 es de al menos un día a 15 días después de la administración de radioinmunoconjugado.

En una realización de la presente invención el uno o más antígenos sobrerregulados se expresan en la superficie de células cancerosas de células B.

- 5 En otra realización de la presente descripción los radioinmunoconjugados de la presente invención infraregularán las células del sistema inmune.

Tales células del sistema inmune pueden estar enfermas, tal como en enfermedades autoinmunes.

- 10 En otra realización de la presente invención la sobrerregulación se realiza antes de la inmunoterapia o la terapia inmuoconjugada en un paciente que padece cáncer o una enfermedad.

- 15 En una realización adicional de la presente invención el paciente padece un tumor maligno de células B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica.

En una realización de la presente invención el paciente padece un tumor maligno de células B que es un linfoma no Hodgkin.

- 20 En una realización de la presente invención el paciente padece un tumor maligno de células B que es leucemia linfoblástica aguda.

En una realización de la presente invención el paciente padece un tumor maligno de células B que es leucemia linfocítica crónica.

- 25 En otra realización la radioinmunoterapia se administra en una dosis baja que, por sí misma, tiene un efecto de baja eliminación de células en los tumores, pero tiene una sobrerregulación significativa del antígeno.

- 30 En el presente contexto el término sobrerregulado se define como una expresión significativamente mayor del antígeno a nivel de proteína o nivel de ARNm.

Esta invención ha demostrado sorprendentemente que un pretratamiento de un tumor maligno de células B que usa anticuerpo HH1 marcado con ¹⁷⁷Lu es capaz de sobrerregular el CD20 objetivo de rituximab.

- 35 De este modo, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un tratamiento combinacional de un tumor maligno de células B usando anticuerpo HH1 marcado con ¹⁷⁷Lu seguido de rituximab desde al menos un día hasta 15 días después de la administración del radioinmunoconjugado.

- 40 Una realización preferida de la presente invención se refiere a anticuerpo HH1 marcado con ¹⁷⁷Lu seguido de rituximab para uso en el tratamiento de un tumor maligno de células B de acuerdo con el patrón de administración anterior.

- 45 Este intervalo entre la administración de anticuerpo HH1 marcado con ¹⁷⁷Lu y rituximab puede optimizarse para generar la sobrerregulación máxima en CD20. El intervalo generalmente será por lo menos un día, 3-5 días o 3-10 días.

- 50 El intervalo también puede ser de 0 a 30 días, más preferiblemente de 3 a 15 días después de la administración de radioinmunoterapia. En el caso de anticuerpos en circulación a largo plazo, incluso el co- o pretratamiento se puede considerar siempre que el anticuerpo esté presente en una concentración sustancial en la sangre en el momento en que tiene lugar la sobrerregulación del antígeno.

- 55 Dentro del alcance de la descripción está el uso de radioinmunoterapia con otros anticuerpos radiomarcados contra CD37 u otros antígenos asociados con cáncer hematológico, por ejemplo, anticuerpos anti-CD20 radiomarcados que incluyen ibritumomab, tositumomab, rituximab, ofatumumab, veltuzumab y ocrelizumab, o anticuerpos CD19, CD21, CD22, HLA-DR, CD23, CD39, CD52, CDw75 o CD80 radiomarcados incluyendo blinatumomab y epratuzumab.

- 60 Los ejemplos de radionucleidos utilizados serían ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹⁷mSn, ¹³¹I, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁵Dy, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁴Ra, ²²⁵Ac, y ²²⁷Th que pueden conjugarse con un conector quelante al anticuerpo o mediante reacción electrofílica o nucleófila con grupos en la proteína.

Radioinmunoconjugados

- 65 Los radioinmunoconjugados pueden ser cualquiera que sea capaz de unirse o dirigirse a un antígeno de interés.

Los radioinmunoconjugados incluyen pero no se limitan a Zevalin, Bexxar y betalutina.

En el presente contexto, betalutina también se denomina ^{177}Lu -HH1, ^{177}Lu -HH-1, ^{177}Lu -tetulomab o ^{177}Lu -tetraxetan-tetulomab.

5 En otra realización de la presente invención el uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados se dirigen a CD20, que es rituximab.

Los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, rituximab, veltuzumab, ofatumumab, afutuzumab, tositumomab, reditux e ibritumomab.

10 En otra realización de la presente invención el uno o más anticuerpos o radioinmunoconjugados se dirigen a CD37.

15 En una realización preferente de la presente invención el radioinmunoconjugado de CD37 es betalutina.

Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser cualquier anticuerpo monoclonal capaz de dirigirse a cualquiera de los antígenos discutidos a continuación.

20 Los anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, rituximab, epratuzumab, 19, F8, F16, galiximab, toralizumab, alemtuzumab, ofatumumab, veltuzumab, afutuzumab, tositumomab, reditux, ibritumomab, K7153A, 37.1 y HH1.

25 En una realización de la presente invención el anticuerpo monoclonal ES HH1 (es decir, tetulomab).

En una realización de la presente invención el anticuerpo monoclonal ES rituximab.

30 Se describen variantes específicas de HH1 en los documentos PCT/IB2012/057230 y PCT/EP2011/051231 que se incorporan aquí como referencia y se describen como realizaciones específicas que se incluyen en esta invención.

Por lo tanto, será posible ajustar la variante de HH1 incluida en los radioinmunoconjugados de la presente invención en base a las divulgaciones mencionadas anteriormente.

35 Dicha variante incluye variantes quiméricas o variantes con una cierta identidad de secuencia con las cadenas de HH1.

En una realización preferente de la presente invención, la HH1 es quimérica valiente o un HH1 humanizado.

40 En otra realización de la presente invención, la variante quimérica de HH1 es chHH1.1 que es el isotipo de HH1 quimérico IgG1 o chHH1.3H que es el isotipo de HH1 quimérico IgG3 con mutación R435H.

En otra realización de la presente invención es el anticuerpo monoclonal rituximab.

Conectores

El radionúclido se puede unir al anticuerpo mediante un conector opcional.

50 Por ejemplo, los radioinmunoconjugados con yodo no necesitan un conector. Esto significa que ^{125}I -HH1 no necesita incluir un conector.

55 El radionúclido se puede unir al anticuerpo haciendo reaccionar primero un quelante bifuncional, p. ej., P-SCN-bn-DOTA (Macrocyclics, Tx, EE. UU.), con el anticuerpo, seguido de purificación para eliminar el quelante no conjugado, y luego reacción del conjugado de anticuerpos quelante con el radionúclido, seguido de purificación para eliminar cualquier radionúclido no conjugado.

Alternativamente, el quelante y el radionúclido pueden combinarse primero y posteriormente conjugarse con el anticuerpo.

60 Los conectores quelantes como, por ejemplo, p-SCN-bn-DOTA, se pueden usar para conjugar otros radionúclidos metálicos a HH1 de manera similar a la descrita para ^{177}Lu .

65 Se podría usar cualquier tipo de conector con suficiente capacidad de complejación y un grupo funcional que permita la conjugación directa o indirecta con una proteína o un péptido. Ejemplos de tales conectores se describen en la bibliografía (por ejemplo, Brechbiel, 2008; Liu, 2008). Algunos ejemplos útiles son los quelantes cíclicos bifuncionales como p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-éster; quelantes lineales bifuncionales como p-SCN-

Bn-DTPA y CHX-A''-DTPA.

Los radionucleidos en la presente invención se conjugarán preferiblemente con una molécula de direccionamiento utilizando quelantes bifuncionales.

5 Estos podrían ser quelantes cíclicos, lineales o ramificados. Se puede hacer referencia particular a los quelantes de poliaminopoliácido que comprenden un esqueleto de poliazaalcano lineal, cíclico o ramificado con grupos ácidos (por ejemplo, carboxialquilo) unidos a nitrógenos de la cadena principal.

10 Ejemplos de quelantes adecuados incluyen derivados de DOTA tales como ácido p-isotiocianatobencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (p-SCN-Bz-DOTA) y derivados de DTPA tales como ácido p-isotiocianatobencilo -dietilentriaminopentaacético (p-SCN-Bz-DTPA), siendo los primeros quelantes cíclicos, los últimos quelantes lineales.

15 La metalización del resto complejante se puede realizar antes o después de la conjugación del resto complejante con el resto diana.

El procedimiento de radiomarcaje en general será más conveniente en términos de tiempo utilizado, etc., si el quelante está conjugado con el anticuerpo antes de que tenga lugar el radiomarcaje.

20 Los principios de preparación de conjugados radiomarcados usando quelantes unidos a anticuerpos se describen más ampliamente en, por ejemplo, Liu, 2008.

25 Por lo tanto, HH1 puede usarse para preparar radioinmunoconjugados con diferencias en propiedades de radiación y periodos de semidesintegración efectivos.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención el conector es un conector quelante seleccionado del grupo que consiste en p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-éster, p-SCN-Bn-DTPA y CHX-A''-DTPA.

30 Los radionucleidos emisores beta y/o alfa con carácter metálico permiten la formación de complejos con los conectores de quelatos bifuncionales a partir de los siguientes ejemplos, pero no limitados a, Bn-TCMC, DOTA, Bn-DOTA, Bn-NOTA, Bn-oxo-DO3A, DTPA, CHX- A-DTPA, Bn-DTPA, Bn-PCTA y moléculas de las clases de calixárenos, criptates y criptandos, etc.

35 Por lo tanto, el conector puede ser un conector quelante bifuncional.

En una realización de la presente invención el conector es un conector quelante.

Radionucleidos

40 Como se mencionó anteriormente, es posible construir radioinmunoconjugados que tienen diferentes propiedades de radiación y periodos de semidesintegración efectivos.

Una parte natural de la construcción de tales radioinmunoconjugados es la elección del radionúclido.

45 En una realización preferente de la presente invención el radionúclido es un radionúclido metálico.

En una realización adicional de la presente invención el radionúclido es un emisor alfa.

50 El emisor alfa se puede seleccionar del grupo que consiste en ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{227}Th .

En una realización adicional de la presente invención el radionúclido es el emisor beta

55 El emisor beta se puede seleccionar del grupo que consiste en ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{177}Lu .

En otra realización de la presente descripción, el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{117}mSn , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{165}Dy , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{224}Ra , ^{225}Ac , y ^{227}Th .

60 Aún en otra realización de la presente descripción, el periodo de semidesintegración del radionúclido es inferior a 24 horas y el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi .

65 En otra realización de la presente descripción, el periodo de semidesintegración del radionúclido es superior a 24 horas y el radionúclido se selecciona del grupo que consiste en ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{117}mSn , ^{131}I , ^{149}Tb , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{165}Dy , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{223}Ra , ^{224}Ra , ^{225}Ac , y ^{227}Th .

Antígenos

- Los antígenos de la presente invención son antígenos que pueden ser sobrerregulados por los radioinmunoconjugados de la presente invención.
- 5 Esta sobrerregulación también puede verse como un aumento o inducción de la expresión del antígeno. La sobrerregulación o aumento se puede medir mediante técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, que incluyen transferencia Western y FACS.
- 10 Puede ser un solo antígeno que está sobrerregulado pero también pueden ser varios.
- Por ejemplo, es posible sobrerregular tanto CD20 como CD37 por los radioinmunoconjugados de la presente invención.
- 15 Por tanto, en una realización de la presente descripción el antígeno sobrerregulado se selecciona del grupo que consiste en CD37, CD19, CD20, CD21, CD22, HLA-DR, CD23, CD39, CD52, CDw75 y CD80.
- En una realización preferente de la presente descripción el antígeno sobrerregulado es CD37.
- 20 Aún en una realización adicional de la presente invención el antígeno sobrerregulado es CD20.
- En otra realización de la presente descripción el antígeno sobrerregulado es CD22
- Los antígenos de células B que se sobrerregulan por radioinmunoterapia o que potencialmente pueden estar sobrerregulados incluyen CD19, CD20, CD22, CD37 y CD52.
- 25 De este modo, en una realización adicional de la presente descripción, se seleccionan los antígenos del listado que consiste en CD19, CD20, CD22, CD37 y CD52.
- 30 Aún en otra realización de la presente descripción los antígenos específicos de células B se seleccionan del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD37.
- En una realización adicional de la presente invención ambos CD20 y CD37 están sobrerregulados por los radioinmunoconjugados de la presente invención.
- 35 En otra realización de la presente descripción ambos son CD22 y CD37 sobrerregulados por los radioinmunoconjugados de la presente invención.
- Aún en otra realización más de la presente descripción ambos CD52 y CD37 están sobrerregulados por los radioinmunoconjugados de la presente invención.
- 40 En otra realización de la presente descripción ambos son CD19 y CD37 sobrerregulados por los radioinmunoconjugados de la presente invención.
- 45 El antígeno también puede ser un antígeno específico para enfermedades o trastornos autoinmunes.
- Cuando el antígeno es específico para una enfermedad autoinmune, el antígeno se infraregula y, por lo tanto, tiene el potencial de tratar, por ejemplo, la inflamación.
- 50 Ejemplos de tales antígenos son TNF- α , IL-2 o inmunoglobulina E.
- En otra realización de la presente descripción, la enfermedad es mieloma múltiple y el antígeno se selecciona del grupo que consiste en CD38, CD138, BCMA, CD317, CS1, CD40, BLYS, CD56, CD52, KMA, GRP78, BAFF, CXCR4 y LMA.
- 55 Los anticuerpos implicados en el tratamiento del mieloma múltiple o en desarrollo para el tratamiento del mieloma múltiple se pueden seleccionar del grupo que consiste en denosumab, elotuzumab, daratumumab, milatuzumab, lucatumumab, MDX-1097, PAT-SM6, tabalumab, ulocuplumab y MDX-1458.
- 60 Los conjugados de anticuerpo fármaco para el tratamiento del mieloma múltiple se pueden seleccionar del grupo que consiste en BT062, milatuzumab-DOX, lorvotuzumab-mertansina.
- Los anticuerpos implicados en la enfermedad ósea osteolítica en pacientes con mieloma múltiple se pueden seleccionar del grupo que consiste en el anticuerpo anti-DKK-1 BHQ-880 que promueve la actividad de las células de los osteoblastos que forman los huesos.
- 65

El denosumab del anticuerpo anti-RANKL reduce la actividad de los osteoclastos que descomponen el tejido óseo.

5 Por lo tanto, en una realización de la presente invención el anticuerpo es denosumab y la enfermedad es osteoporosis.

El antígeno de angiogénesis VEGF puede ser un anticuerpo anti-VEGF bevacizumab que previene el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en las células cancerosas.

10 Por lo tanto, en una realización de la presente descripción, la angiogénesis en células cancerosas está dirigida, el antígeno es VEGF y el anticuerpo es bevacizumab.

Dentro del alcance de la descripción está el uso de un anticuerpo radiomarcado contra uno de los antígenos de mieloma antes mencionados para inducir la sobreexpresión del antígeno.

15 Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos se aplican habitualmente en el tratamiento de enfermedades formuladas en composiciones farmacéuticas.

20 Tales composiciones se optimizan para parámetros tales como tolerancia fisiológica y vida útil.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el radioinmunoconjugado se formula como una composición farmacéutica.

25 Una realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se describió anteriormente, que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

30 En otra realización de la presente invención, se mencionan uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de agentes que inducen apoptosis.

Usualmente, un elemento importante de una composición farmacéutica es una solución tampón, que mantiene sustancialmente la integridad química del radioinmunoconjugado y es fisiológicamente aceptable para infusión en pacientes.

35 En una realización de la invención la composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Vehículos farmacéuticos aceptables incluyen, pero no están limitados a, tampones no tóxicos, cargas, soluciones isotónicas, etc. Más específicamente, el vehículo farmacéutico puede ser, pero sin limitación, solución salina normal (0,9%), solución salina semi-normal, lactato de Ringer, dextrosa al 5%, dextrosa al 3,3% / solución salina al 0,3%. El vehículo fisiológicamente aceptable puede contener un estabilizador radiolítico, por ejemplo, ácido ascórbico, que protege la integridad del radiofármaco durante el almacenamiento y la expedición.

45 Una realización de la presente invención comprende la composición farmacéutica de la presente invención y uno o más anticuerpos adicionales o radioinmunoconjugados.

Método de tratamiento

50 El uso terapéutico de un radioinmunoconjugado de acuerdo con la presente descripción puede ser para el tratamiento contra células malignas que expresan un antígeno como se describe en la presente memoria, que incluye, pero no se limita a un tumor maligno de células B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin de células B, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma linfoplasmacítico, leucemia linfoblástica aguda y mieloma múltiple.

55 Otros usos podrían ser el tratamiento de enfermedades autoinmunes y el tratamiento de los efectos relacionados con el trasplante.

60 De este modo, un aspecto de la presente descripción se refiere a un método para sobreexpresar la expresión de antígeno que comprende la administración de un radioinmunoconjugado a una persona en la que sería ventajosa una expresión de antígeno sobreexpresada.

65 Una realización de la presente descripción se refiere a un método de tratamiento de una malignidad de células B o una enfermedad o trastorno del sistema inmune en el que CD20 es el objetivo y el radioinmunoconjugado es capaz de regular positivamente la expresión del antígeno CD20.

En una realización preferida de la presente descripción el radioinmunoconjugado es capaz de sobrerregular la expresión de antígeno de CD20 betalutina y CD20 está dirigido por rituximab o una variante de este.

5 Un aspecto de la presente descripción se refiere a un tratamiento combinacional de una neoplasia maligna de células B o una enfermedad o trastorno del sistema inmune utilizando betalutina seguida de rituximab, obinutuzumab o un anticuerpo terapéutico CD20 similar.

10 En una realización de la presente descripción la persona padece un tumor maligno de células B o una enfermedad o trastorno del sistema inmune.

En otra realización de la presente invención, se usa una terapia combinacional en la que el radioinmunoconjugado es seguido por un tratamiento simultáneo o posterior con terapia de anticuerpos, terapia inmunoconjugada o una combinación de los mismos, como se describió anteriormente.

15 La terapia podría administrarse como monoterapia o en combinación con otras terapias, preferentemente tratamientos estándar. Tales otras terapias pueden ser pretratamiento, cirugía, quimioterapia (incluyendo doxorrubicina, vinblastina y gemcitabina), inmunoterapia, terapia con anticuerpos, terapia fotodinámica, inhibidor del proteasoma (incluido bortezomib), inhibidores de la histona deacetilasa (incluyendo vorinostat y ácido suberoilánilida hidroxámico), vitamina D3 y análogos de vitamina D3, inhibidores del punto de control del ciclo celular (incluidos UCN-01 y 2- (4- (4-Clorofenoxi)fenil) -1H-bencimidazol-5-carboxamida), radiosensibilizadores de células hipóxicas (que incluyen metronidazol y misonidazol), inductores de apoptosis (incluso con witaferina A) radiosensibilizadores, radioinmunoterapia o una combinación de dos o más de estos.

20 Por administración se entiende infusión intravenosa o inyección intravenosa. Más específicamente, el radioinmunoconjugado de la presente invención se puede administrar directamente en una vena mediante una cánula periférica conectada a una cámara de goteo que evita la embolia de aire y permite una estimación del caudal en el paciente.

25 En una realización el radioinmunoconjugado se puede administrar de una manera repetida.

30 En otra realización el radioinmunoconjugado seguido de anticuerpo monoclonal (o inmunoconjugado) pueden administrarse ambos de una manera repetida.

35 En otra realización de la presente invención el radioinmunoconjugado podría administrarse de manera repetida pero con diferentes radionúclidos, por ejemplo, radioinmunoterapia beta podría ser seguida por radioinmunoterapia alfa o viceversa.

40 Un aspecto de la presente invención se refiere al uso del radioinmunoconjugado de la presente invención para el tratamiento de tumores malignos de células B.

Una realización de la presente invención se refiere al uso del radioinmunoconjugado de la presente invención administrado en combinación con o además de otra terapia.

45 En una realización de la presente invención las otras terapias se seleccionan de pretratamiento, quimioterapia, terapia con anticuerpos monoclonales, cirugía, radioterapia y/o terapia fotodinámica.

En otra realización de la presente invención las otras terapias son el trasplante de médula ósea o el trasplante y/o terapia de células madre.

50 En una realización de la presente invención la dosificación de anticuerpos es de 1-1000 mg por paciente, más preferiblemente de 5-50 mg por paciente, y ¹⁷⁷Lu asciende a 1-200 MBq/kg, más preferiblemente de 10-100 MBq/kg de peso corporal.

Terapia combinacional

55 Como se indicó anteriormente los radioinmunoconjugados pueden usarse en combinación con otros tipos de terapia.

60 Por tanto, en una realización adicional de la presente invención, se usa una terapia combinacional en la que el radioinmunoconjugado se sigue con tratamiento simultáneo o posterior con terapia de anticuerpos, inmunoconjugado o una combinación de los mismos, en el que la combinación es un radioinmunoconjugado que comprende un anticuerpo monoclonal HH1 que direcciona CD37, un conector opcional, un radionúclido ¹⁷⁷Lu, y un anticuerpo anti-CD20 que es rituximab, y es para uso en el tratamiento de un tumor maligno de células B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda, y leucemia linfocítica crónica, en donde; el radioinmunoconjugado sobrerregula la expresión de antígeno de un antígeno expresado en la superficie de las células cancerosas de células B, - el antígeno sobrerregulado es CD20, - la sobrerregulación

es seguida por la terapia con anticuerpos anti-CD20 en una sola administración o en un patrón de administración repetida, y la administración de anticuerpo anti-CD20 es desde al menos un día hasta 15 días después de la administración de radioinmunoconjugado.

- 5 En otra realización de la presente descripción es el antígeno CD20 sobrerregulado y la sobrerregulación es seguida por la terapia con anticuerpo anti-CD20 con rituximab en una única administración o en un patrón de administración repetido.

10 Por lo tanto, es posible usar los presentes radioinmunoconjugados para sobrerregular otros antígenos distintos del antígeno al que se dirigen los radioinmunoconjugados.

Por lo tanto, en otra realización más de la presente descripción, el tratamiento simultáneo o posterior al tratamiento se dirige a un antígeno diferente del radioinmunoconjugado.

- 15 El patrón de administración puede ser en una administración única en la que los radioinmunoconjugados sobrerregulan y la expresión de uno o más antígenos que luego son dirigidos por una dosis única o varias dosis de terapia específica de antígeno.

20 Tal terapia puede ser un anticuerpo monoclonal tal como rituximab o HH1 dependiendo del antígeno en cuestión.

La terapia puede repetirse en un patrón cíclico donde la administración de los radioinmunoconjugados y los anticuerpos monoclonales se repiten una, dos o varias veces.

- 25 Una ventaja de tal administración es que la célula diana puede tratarse con el mismo o diferentes anticuerpos en cada ciclo, asegurando que el antígeno con la expresión más alta esté enfocado.

Una estrategia en la que varios antígenos están enfocados limita el riesgo de deriva expresiva de los antígenos expresados en la superficie de las células diana.

- 30 Cabe destacar que los modos de realización y las características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplica a los otros aspectos de la invención.

Todas las referencias de patentes y no patentes citadas en la presente solicitud se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

- 35 La invención se describirá ahora con mayor detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

- 40 Ejemplo 1. Tratamiento con betalutina (¹⁷⁷Lu-tetraxetan-tetulumab, o ¹⁷⁷Lu-HH1) y efecto sobre la expresión del antígeno

Materiales y métodos

- 45 Etiquetado de anticuerpos

El etiquetado del anticuerpo HH-1 con p-SCN-Bn-DOTA y ¹⁷⁷Lu se realizó siguiendo los procedimientos estándar descritos en Dahle et al. (2013) y Repetto-Llamazares et al. (2013). La pureza radioquímica (RCP) del radioinmunoconjugado (RIC) se evaluó usando cromatografía de capa fina instantánea. Si el RCP estaba por debajo del 95%, el conjugado se purificó usando columnas Econo-Pac 10 DG (Bio-rad Laboratories, California, EE.UU.). RCP fue superior al 97% para todos los RIC utilizados en los experimentos. La actividad específica de betalutina fue de 92 MBq/kg con una concentración de anticuerpo de 178 µg/ml. Las fracciones inmunorreactivas (IRF) de los RIC se estimaron usando células de linfoma Ramos y Daudi y un ensayo de un punto. Se utilizó una concentración celular de 75 millones de células/ml. Las células incubadas con tetulumab frío se usaron para evaluar la unión no específica. Las células bloqueadas y desbloqueadas se incubaron durante 1,5 h con 40 ng/ml de radioinmunoconjugado. La actividad añadida se midió usando un detector gamma calibrado (detector de autogama Cobra II, Packard Instrument Company, Meriden, CT, EE.UU.). Después, las células se lavaron tres veces con PBS con BSA al 0,5% y se midió la actividad unida en el contador gamma. IRF se estimó sustrayendo la unión no específica medida usando las muestras bloqueadas a la actividad unida de las muestras no bloqueadas. El IRF fue 52 +/- 3 en células Daudi y 75 +/- 1 en células Ramos. El etiquetado de rituximab con Alexa 647 se realizó utilizando el correspondiente kit de etiquetado de proteínas Alexa Fluor (Molecular Probes, Life Technologies) de acuerdo con el procedimiento proporcionado por el fabricante.

- 65 Tratamiento de células

El día 0, las células Daudi se diluyeron a 1 millón de células/ml usando RPMI 1640 suministrado con 10% de

SFB. Se tomaron luego alícuotas de las células en dos matraces de cultivo celular, cada uno conteniendo 6 ml. Uno de los matraces recibió alrededor de 4,6 MBq de ^{177}Lu -tetraxetan-tetulumab (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mientras que el otro no recibió ningún tratamiento. Ambos matraces se incubaron durante 24 h, se lavaron y se resuspendieron en medio nuevo hasta una concentración de 0,5 millones de células/ml. La dosis de radiación absorbida en el medio de las células tratadas fue de aproximadamente 1,1 Gy. Se tomaron luego alícuotas tanto de las células tratadas como de las de control en matraces de cultivo celular que correspondían a cada punto de tiempo a medir. Cada matraz celular contenía alrededor de 5 ml de suspensión celular. El medio fresco no se administró a las células hasta el final del experimento 72 h después del tratamiento.

10 Medidas por citometría de flujo

En cada punto de tiempo las células control se tiñeron con 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la tinción de ADN Hoechst33342 (H33342) durante 20 minutos a 37° C. Posteriormente, las células de control y tratadas se lavaron y mezclaron. Las células se incubaron durante 20 minutos con tetulumab frío para saturar todos los sitios CD37. Posteriormente las células se lavaron con PBS y el anticuerpo anti-CD20 rituximab conjugado con Alexa647 y se añadieron a la solución un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón (conjugado con ficoeritrina (PE) (DakoCytomation). Después de la incubación en hielo durante 30 minutos se lavaron las muestras y se midieron usando citometría de flujo. El aumento en la expresión del antígeno (CD37 o CD20) se calculó como la diferencia en las mediciones de intensidad (en %) entre las células control y las tratadas. El control y las células tratadas se distinguieron por activación en la fluorescencia azul de la tinción H3342 en el ADN de las células control. La sobrerregulación de CD20 se evaluó durante 0, 18, 24, 48 y 72 horas. CD37 se evaluó a las 24 y 48 h. Para controlar que el conejo anti-ratón Ab no influyese en las mediciones de CD20, la tinción con y sin el Ab anti-ratón se realizó a las 24 h y 48 h.

25 *Resultados*

Hubo un aumento en la expresión de CD20 de aproximadamente el 130% frente al control no tratado para la mayoría de los puntos de tiempo (figura 1). Hubo un aumento en la expresión de CD37 de aproximadamente el 60% (figura 1). No hubo interacción entre rituximab y el anticuerpo anti-ratón de conejo ya que el aumento en la expresión de CD20 en muestras con y sin anticuerpo de conejo fue similar.

Conclusión

Los antígenos CD20 y CD37 se sobrerregularon después de que las células se trataran con ^{177}Lu -tetraxetan-tetulumab. El aumento fue aproximadamente constante para todos los puntos de tiempo y alrededor del 130% para CD20 y aumentó de 30 a 60% para CD37 entre 48 y 72 h después del tratamiento.

Ejemplo 2

40 *Introducción*

Para evaluar si el efecto de ^{177}Lu -tetulumab se debió a radiación celular específica, las células Daudi se incubaron con betalutina durante 1 h.

45 *Materiales y métodos*

Etiquetado de anticuerpos

El procedimiento utilizado para etiquetar los anticuerpos y calcular el IRF se ha discutido previamente en el Ejemplo 1. La actividad específica de control para cada uno de los tratamientos como se describe en el ejemplo 1. Se agregó la misma cantidad de actividad a ambos tratamientos (4,6 MBq, la misma actividad que se da en el ejemplo 1). Cada 2 a 5 días las células se dividieron y se añadió medio fresco de modo que la concentración celular estuvo entre 0,5 y 1 millón de células/ml después de la dilución.

Tratamiento de células

El procedimiento seguido para tratar las células fue similar al descrito en el ejemplo 1. Se evaluaron dos tratamientos diferentes en este ejemplo. Un tratamiento involucró la incubación de células durante 24 horas, de manera similar a lo que se hizo en el ejemplo 1. El otro tratamiento implicó la incubación de las células durante 1 hora. Se prepararon células de control para cada uno de los tratamientos como se describe en el ejemplo 1. Se agregó la misma cantidad de actividad a ambos tratamientos (4,6 MBq, la misma actividad que se da en el ejemplo 1). Cada 2 a 5 días las células se dividieron y se añadió medio fresco de modo que la concentración celular estuvo entre 0,5 y 1 millón de células/ml después de la dilución.

Medidas por citometría de flujo

La tinción de las células y la medición de la sobrerregulación del antígeno en las células tratadas en comparación con las células control se llevó a cabo usando el mismo procedimiento que el descrito en el ejemplo 1. Las

mediciones se realizaron en puntos de tiempo entre 0 y 14 días.

Resultados

- 5 La dosis al medio de las células incubadas durante 1 h fue de aproximadamente 0,05 Gy mientras que la dosis a las células incubadas durante 24 horas fue de aproximadamente 1,1 Gy. Las células incubadas durante 1 h tuvieron un aumento del 45,5% en CD20 y un aumento del 3,8% en CD37 48 h después de la exposición y 48,8% y 15,1% respectivamente 144 h después de la exposición indicando que la radiación celular específica del radioinmunoconjugado fue un componente importante para el efecto, particularmente para el antígeno CD20 (figura 2). La sobrerregulación de los antígenos parece disminuir hacia 0 después de 14 días.

Ejemplo 3

Introducción

- 15 Para estudiar si la sobrerregulación de los antígenos era una característica general del linfoma más que un efecto específico de la línea celular, las células Daudi se analizaron junto con las otras tres líneas de células de linfoma, Raji, Ramos y Rec-1.

20 Materiales y métodos

Etiquetado de anticuerpos

- 25 El procedimiento utilizado para etiquetar los anticuerpos y calcular el IRF se ha discutido previamente en el Ejemplo 1. La actividad específica de ¹⁷⁷Lu-tetulumab fue de 212 MBq/mg y la concentración de Ab fue de 0,5 mg/ml. El IRF fue 72 +/- 2% y se midió en células Ramos.

Tratamiento de células

- 30 El procedimiento seguido para tratar las células fue similar al descrito en el ejemplo 1. Las células se incubaron durante 1 hora. Se prepararon células de control para cada una de las líneas celulares como se describe en el ejemplo 1. Se agregó la misma cantidad de actividad a las líneas celulares (4,6 MBq, la misma actividad que se da en el ejemplo 1). La dosis al medio de las células fue de aproximadamente 0,05 Gy. Cada 2 a 5 días las células se dividieron y se añadió medio fresco de modo que la concentración celular estuvo entre 0,5 y 1 millón de células/ml después de la dilución.

Medidas por citometría de flujo

- 40 La tinción de las células y la medición de la sobrerregulación del antígeno en las células tratadas en comparación con las células de control se llevó a cabo usando el mismo procedimiento que el descrito en el ejemplo 1. Las mediciones se realizaron en puntos de tiempo entre 0 y 7 días.

Resultados

- 45 La sobrerregulación de antígenos parece ser general para las células de linfoma no Hodgkin. El aumento en CD20 se observó en todas las líneas celulares, mientras que el aumento en la expresión de CD37 se observó en 3 de las 4 líneas celulares (Tabla 1). En conclusión, la exposición al radioinmunoconjugado ¹⁷⁷Lu-tetulumab causa aumentos en CD20 y CD37 y esta parece ser una característica general de los linfomas de células B.

- 50 Ejemplo 4. Efecto en la expresión del antígeno de direccionamiento de CD20 con ¹⁷⁷Lu-rituximab.

Introducción

- 55 Para estudiar si el efecto era una característica general de los radioinmunoconjugados en lugar de un efecto específico de betalutina (es decir, ¹⁷⁷Lu-HH-1 o ¹⁷⁷Lu-tetulumab), las células Daudi y Raji se trataron con ¹⁷⁷Lu-rituximab.

Materiales y métodos

- 60 Etiquetado de anticuerpos

- 65 El procedimiento utilizado para etiquetar rituximab y calcular el IRF se ha discutido previamente en el Ejemplo 1. La actividad específica de ¹⁷⁷Lu-rituximab fue de 165 MBq/mg y la concentración de Ab fue de 0,2 mg/ml. El IRF fue 60 +/- 2% y se midió en células Ramos. El etiquetado de tetulumab con Alexa 488 se realizó utilizando el correspondiente kit de etiquetado de proteínas Alexa Fluor (Molecular Probes, Life Technologies) de acuerdo con el procedimiento proporcionado por el fabricante.

Tratamiento de células

5 El procedimiento seguido para tratar las células fue similar al descrito en el ejemplo 1. Las células se incubaron durante 1 hora o 24 horas. Se usaron células de linfoma Daudi y Raji. Se prepararon células de control para cada una de las líneas celulares como se describe en el ejemplo 1. Se agregó la misma cantidad de actividad a las líneas celulares (4,6 MBq, la misma actividad que se da en el ejemplo 1). La dosis al medio de las células fue de aproximadamente 0,05 Gy. Cada 2 a 5 días las células se dividieron y se añadió medio fresco de modo que la concentración celular estuvo entre 0,5 y 1 millón de células/ml después de la dilución.

10 Medidas por citometría de flujo

15 La tinción de las células y la medición de la sobrerregulación del antígeno en las células tratadas en comparación con las células de control se llevó a cabo usando el mismo procedimiento que el descrito en el ejemplo 1. Las mediciones se realizaron en puntos de tiempo entre 0 y 7 días. Dado que ^{177}Lu -rituximab se une a CD20 y que el mismo anticuerpo se utilizó para medir la intensidad de la fluorescencia, los resultados encontrados dan un valor mínimo para la sobrerregulación de CD20. La sobrerregulación de CD37 se evaluó usando tanto Ab secundario (conejo anti-ratón) como Ab directo (tetulomab unido a Alexa488).

20 Resultados

También se observó una sobrerregulación en CD20 y CD37 cuando las células se tratan con ^{177}Lu -rituximab (Tabla 2). Por lo tanto, la sobrerregulación de antígenos no es un efecto específico de ^{177}Lu -tetulomab.

25 Ejemplo 5

Introducción

30 Para confirmar que la radioinmunoterapia aumentaría la unión del anticuerpo a las células en un ensayo diferente, las dos líneas celulares Daudi (linfoma no Hodgkin) y JMV-3 (leucemia de células B) se trataron con ^{177}Lu -HH-1 (anti-CD37) y posteriormente se midió la unión de rituximab marcado con ^{125}I (anti-CD20).

Métodos:

35 Se preparó ^{125}I -rituximab usando tubos de yodogén (Pierce). Se lavó un tubo de yodogén con 1 ml de tampón tris y posteriormente se añadieron 100 μl de tampón tris (pH 7,5) y se añadió yodo ^{125}I . La solución se agitó suavemente en el tubo unas pocas veces durante un período de 6 minutos en el que se añadió una o toda la solución de ^{125}I a un vial con típicamente 100 μl de tris con 50-200 μg de anticuerpo OI-3.

40 Usando remolinos ocasionales del vial la reacción continuó durante 7 minutos. Después de eso se añadieron 50 μl de l-tirosina (saturada) en tris y se hizo reaccionar durante al menos 5 minutos antes de purificar la solución usando una columna de filtración en gel Sephadex G-25 PD-10 (GE Health).

45 Aproximadamente el 70% de la actividad eluiría en las fracciones de alto peso molecular y se recogió y usó en el experimento de unión celular. El anticuerpo HH-1 se etiquetó primero con p-SCN-Bn-DOTA disuelto en HCl 0,005M. La relación molar de p-SCN-Bn-DOTA a anticuerpo fue de 6:1. La reacción se ajustó al pH a $8,5 \pm 0,2$ usando tampón de carbonato. Después de 45 minutos de incubación a 37°C la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μl de solución de glicina 0,2 M/mg de Ab. Para eliminar el quelante libre el anticuerpo conjugado se lavó diluyendo el conjugado de anticuerpo 1:10 con NaCl al 0,9% y se concentró por centrifugación con tubos de centrífuga AMICON-30 (Millipore, Cork, Irlanda). Este procedimiento se repitió 4-5 veces. Antes de etiquetar con 220 MBq ^{177}Lu (Perkin Elmer, Boston, Ma, EE. UU.), 1 mg de conjugado de anticuerpo, se ajustó el pH a $5,3 \pm 0,3$ usando tampón de acetato de amonio 0,25 M. Se incubó la reacción durante 15 horas a 37°C . La pureza radioquímica (RCP) del radioinmunoconjugado (RIC) se evaluó usando cromatografía en capa fina instantánea (ITLC). El PCR fue 95,5%. Las fracciones inmunoactivas (IRF) de los RIC se midieron usando células de linfoma Ramos (^{177}Lu -HH1) o Daudi (^{125}I -rituximab) y un ensayo de un punto. Se utilizó una concentración celular de aproximadamente 50 millones de células/ml. Dos tubos no se bloquearon y se pretrataron 2 tubos con 10 μg de HH-1, después de lo cual se añadieron 2 ng de ^{177}Lu -HH1 y se agitaron durante 1,5 horas. A continuación, los tubos se contaron en un contador gamma para determinar la actividad aplicada, se lavaron y se centrifugaron tres veces con 0,5 ml de DPBS/BSA antes de contar los tubos para la actividad unida a la célula. La actividad unida a la célula se corrigió para unión no específica restando los recuentos de los tubos bloqueados. El IRF, es decir, unión específica frente al total aplicado, fue 78% (^{177}Lu -HH1) y 71% (^{125}I -rituximab). Los matraces de cultivo celular (25 cm², Corning) que contienen 5 ml de RPMI 1640 suministrados con 10% de FBS y con 1 millón de células por ml se añadieron 2,5 MBq ^{177}Lu -Bn-DOTA-HH-1 (^{177}Lu -HH-1), Bn-DOTA-HH-1 (DOTA-HH-1, grupo de control 1) o tampón de formulación, es decir, la misma solución que los otros dos tratamientos excepto RIC o el conjugado de anticuerpo (grupo de control 2) en 16,7 microlitros. Después de un día se retiraron 2 ml y se

añadieron 3 ml de medio fresco (dilución de 1,7 veces), después de tres días se añadieron 3 ml de medio (dilución de 1,5 veces), después de cinco días se retiraron 4 ml y se añadieron 3 ml de medio fresco (dilución de 1,8 veces), en el día ocho se retiraron 6 ml y se añadieron 5 ml de medio fresco (dilución de 2,7 veces), en el día once, se retiraron 7 ml y se añadieron 4 ml de medio fresco (dilución de 5 veces). Esto se hizo para reabastecerse con medio de crecimiento y simular la reducción en la concentración con el tiempo visto in vivo con RIC. Después de 3,5 días se retiraron las suspensiones celulares y se midió la concentración y viabilidad celular usando un contador celular automatizado Countess (Invitrogen) y se añadieron 0,5 ml a los tubos de reacción, se centrifugó y el sedimento celular se resuspendió en 200 μ l de DPBS (Gibco) con 0,5% de BSA (VWR). A dos tubos en el grupo ^{177}Lu -HH-1 se añadieron 0,8 μ g, es decir, aproximadamente 1,6 μ g/ml de ^{125}I -rituximab en 10 μ l de DPBS/BSA y a dos tubos se añadieron solo DPBS (para corregir la interferencia de ^{177}Lu en la ventana de ^{125}I). A dos tubos en el grupo de control 1 y 2 se agregaron 0,8 μ g, es decir, aproximadamente 1,6 μ g/ml de ^{125}I -rituximab en 10 μ l de DPBS/BSA y 10 μ l de tampón DPBS/BSA. Los tubos se incubaron durante 1,5 horas y a continuación se lavaron y centrifugaron dos veces antes de contarlos en la ventana de ^{125}I de un contador gamma Cobra II Autogamma (Packard). Los recuentos en el grupo ^{177}Lu -HH-1 se corrigieron para los recuentos cruzados de ^{177}Lu a en la ventana de ^{125}I mediante el uso de las mediciones de los dos tubos a los que no se añadió ^{125}I -rituximab.

Resultados

La actividad de unión a células se ajustó para el número de células y la interferencia de ^{177}Lu en la ventana de ^{125}I y las comparaciones entre los controles tratados y no tratados con RIC 1 (el conjugado de anticuerpo excepto el ^{177}Lu) y 2 (la solución tampón del RIC) se presentan en la Tabla 3. Se muestra que las células tratadas con RIC tuvieron una unión aumentada de ^{125}I -rituximab en todos los puntos de tiempo hasta 15 días después de comenzar la terapia con ^{177}Lu -HH1.

Conclusión

Como se muestra en la tabla 3, tanto el linfoma de células B como las células de leucemia de células B mostraron un aumento de la unión del ^{125}I -rituximab después de la exposición a ^{177}Lu -HH1. Esto indica que la radioinmunoterapia podría ser beneficiosa como terapia de inducción en pacientes sometidos a terapia con anticuerpos monoclonales, por ejemplo, tratamiento con rituximab contra el linfoma y la leucemia.

Ejemplo 6. Evaluación de unión no específica.

Antecedentes:

Para verificar que el aumento de la unión del anticuerpo específico del antígeno a las células expuestas a la radioinmunoterapia no fue causado por el aumento de la unión no específica a las células se realizó un experimento que usa bloqueo antigénico.

Parte experimental:

Células Daudi, aproximadamente 1 millón por ml en frascos de cultivo de 25 cm^2 , se expusieron a anticuerpo HH1 no etiquetado (control 1), tampón de formulación (control) o 0,1 MBq/ml o 0,5 MBq/ml de ^{177}Lu -HH1 durante tres días. Después de un día la concentración se redujo al 50% añadiendo medio nuevo. En el día tres se retiraron las suspensiones de células y se usaron para el ensayo de unión y se trataron como en el ejemplo 4, con tubos duplicados de los grupos de árboles que recibieron ^{125}I -rituximab. Además, los duplicados de cada grupo se trataron con rituximab sin etiquetar (100 μ g/ml) durante media hora para bloquear el antígeno CD20. Para corregir para ^{177}Lu en duplicados de ventana de ^{125}I de los dos grupos radiactivos se utilizaron sin ^{125}I -rituximab añadido y se trataron y lavaron de la misma manera que los tubos de ensayo con ^{125}I -rituximab. Después de la adición de ^{125}I -rituximab, los tubos de ensayo se incubaron durante dos horas y se contaron para la actividad aplicada. Se usó un contador de gamma automático Cobra II (Packard Instruments Company Inc, Downers Grove, IL, EE.UU.). A continuación, los tubos de ensayo se lavaron dos veces con DPBS/BSA al 0,5% y se centrifugaron dos veces y se contaron para la actividad unida a la célula. Los datos se corrigieron por el derrame gamma en la ventana de ^{125}I de ^{177}Lu en las células tratadas.

Resultados:

Al comparar los recuentos netos de actividad por célula en los tubos bloqueados frente a no bloqueados los resultados fueron los siguientes: 0,1 y 0,5 MBq/ml de grupos, 0,8% y 1,1% de unión no específica; controles 1 y control 2, 1,3% y 1,1% de unión no específica.

Conclusión:

El bloqueo del antígeno fue igualmente eficaz en células tratadas y no tratadas. Por lo tanto el aumento de la

unión a células tratadas con radioinmunoconjugado no fue provocado por una unión no específica y, por lo tanto, debe ser causada por una mayor expresión de antígeno.

Ejemplo 7. Tratamiento con betalutina (^{177}Lu -tetraxetan-tetulumab, o ^{177}Lu -HH1) y el efecto sobre la expresión del antígeno CD20 in vivo

Este ejemplo verifica que el efecto de sobrerregulación del antígeno desde ^{177}Lu -HH1 también se observa in vivo. Se midieron las biodistribuciones y la captación tumoral en ratones desnudos portadores de xenografts Ramos subcutáneos 3 días después del tratamiento con betalutina o con una inyección de control de HH1 frío.

Método:

Etiquetado de tetulumab con ^{177}Lu

El quelante p-SCN-Bn-DOTA (DOTA) se disolvió en HCl 0,005 M, se añadió al anticuerpo en una proporción de 6:1 y se ajustó el pH a aproximadamente 8,5 usando tampón de carbonato. Después de 45 minutos de incubación a 37°C , la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μl por mg de Ab de solución de glicina 0,2 M. Para eliminar el DOTA libre, el anticuerpo conjugado se lavó usando tubos de centrifuga AMICON-30 (Millipore, Cork, Irlanda) 4-5 veces con NaCl al 0,9%. Antes de marcar con ^{177}Lu el pH se ajustó a $5,3 \pm 0,3$ usando tampón de acetato de amonio 0,25 M. Se añadieron aproximadamente 150 MBq de ^{177}Lu (Perkin Elmer, Boston, Ma, EE. UU.) a 0,5 mg de DOTA-Ab, y se incubaron durante 20 minutos a 37°C . La actividad específica fue de 250 MBq/mg. La pureza radioquímica (RCP) del conjugado se evaluó usando cromatografía de capa fina instantánea. Si el RCP estaba por debajo del 95%, el conjugado se purificaba usando columnas Econo-Pac 10 DG (Bio-rad Laboratories, California, EE.UU.).

Etiquetado de rituximab con ^{125}I

Rituximab se etiquetó con ^{125}I mediante yodación indirecta utilizando tubos de yodación prerrecubiertos IODOGEN (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con la descripción del fabricante. Después de completar la reacción con L-tirosina la mezcla de reacción se eluyó a través de la columna Sephadex G-25 PD-10 para eliminar los compuestos de bajo peso molecular. La actividad específica del producto final fue de 12 MBq/mg. Se cultivaron la fracción inmunorreactiva de ^{177}Lu -HH1 y suspensiones celulares simples de ^{125}I -rituximab de células individuales de linfoma de Ramos en medio RPMI 1640 (PAA, Linz, Austria) suplementado con 10% de FCS inactivado por calor (PAA), 1% de L-glutamina (PAA) y 1% de penicilina-estreptomina (PAA) en una atmósfera húmeda con 95% de aire/5% de CO_2 . La inmunorreactividad de los radioinmunoconjugados se midió usando un método de Lindmo modificado de un punto. Las concentraciones de células utilizadas fueron de 75 millones de células/ml. La inmunorreactividad de los conjugados estaba entre 60% y 82%.

Animales

Ratones Foxn1nu desnudos atímicos hembra criados a tal efecto que tenían alrededor de 8-9 semanas de edad y tenían pesos corporales de aproximadamente 22 g al inicio del experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se suministraron alimentos y agua a voluntad. Todos los procedimientos y experimentos con animales en este estudio fueron aprobados por la Autoridad Nacional de Investigación Animal y llevados a cabo de acuerdo con el Convenio Europeo para la Protección de Vertebrados Usados con Fines Científicos. Se inyectó a los ratones por vía subcutánea en ambos flancos 50 μl de una solución mullida de tejido tumoral de linfoma de Ramos ligeramente diluido con aproximadamente 300 μl de NaCl por cada ml de solución mullida de tumor.

Experimentos de absorción de biodistribución

La biodistribución de ^{125}I -rituximab y ^{177}Lu -HH1 se determinó en ratones Foxn1nu desnudos con xenoinjertos Ramos con diámetros entre 5 y 14 mm al inicio del estudio. Las preparaciones se administraron por inyección en la vena de la cola de 100 μl de solución a cada animal. Se administró una dosis de aproximadamente 350 MBq/kg de betalutina, equivalente a una dosis proteica de 2,3 mg/kg (los ^{177}Lu -HH-1 se habían almacenado antes del uso, por lo tanto, la actividad específica se redujo) a 5 ratones (tratados ratones). El grupo de control consistió en 7 ratones a los que se les inyectó la misma dosis de proteína de HH1 frío que los tratados (2,3 mg/kg). Dos días después de la inyección de betalutina o HH1 frío a todos los ratones se les inyectaron 3 mg/kg de ^{125}I -rituximab. Tres días después de la inyección de ^{125}I -rituximab, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se realizaron autopsias. Se determinó el peso de cada muestra de tejido y se midió la cantidad de ^{177}Lu y ^{125}I mediante un detector gamma calibrado (detector de autogamma Cobra II, Packard Instrument Company, Meriden, CT, EE.UU.). Las muestras de los inyectados se usaron como referencias en los procedimientos de medición. Los porcentajes de descomposición corregidos de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) se calcularon para cada punto de tiempo. La actividad en los órganos se midió mediante el uso de un ajuste de doble ventana donde se midieron actividades de ^{177}Lu y ^{125}I simultáneamente. Se usaron tubos en blanco solo

5 con ^{177}Lu o ^{125}I para evaluar el cruce desde las ventanas. El cruce de la ventana de ^{125}I a la ventana de ^{177}Lu fue de aproximadamente el 0,006% y se consideró insignificante. Por otro lado, el cruce de la ventana de ^{177}Lu a la ventana de ^{125}I fue de aproximadamente el 10% y todos los datos se corrigieron en consecuencia. Además las muestras se dejaron descomponer durante 10 semanas (aproximadamente 10 periodos de semidesintegración de ^{177}Lu) y se volvieron a contar para corroborar la eficacia de las correcciones.

Resultados:

10 La figura 6 muestra la biodistribución de ^{125}I -rituximab 3 días después de la inyección de ^{125}I -rituximab. Los ratones se habían inyectado 5 días antes con 350 MBq/kg de betalutina (tratado) o HH1 frío (control). La captación en órganos normales fue similar en ambos grupos ($p > 0,05$) mientras que la captación en el tumor fue aproximadamente 3 veces mayor en los ratones tratados ($p = 3,19 \cdot 10^{-10}$). El% de ID/g medio en el tumor en los ratones de control fue de $1,3 \pm 0,2$ mientras que fue de $3,6 \pm 0,7$ en los ratones tratados.

15 Conclusiones:

20 El tratamiento con betalutina aumentó la captación tumoral 3 veces al tiempo que mantenía constante la captación en órganos normales en comparación con los ratones tratados con HH1 frío. Estos resultados junto con los datos mostrados en ejemplos previos indican que el tratamiento con betalutina sobregula el antígeno CD20 in vivo y esto se traduce en una captación tumoral sustancialmente mayor.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de:
- 5 a) un radioinmunoconjugado que comprende:
- un anticuerpo monoclonal HH1 dirigido a CD37,
 - un conector opcional,
 - 10 - un radionúclido de ¹⁷⁷Lu, y
- b) un anticuerpo anti-CD20 que es rituximab, para uso en el tratamiento de un tumor maligno de células B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica;
- 15 en la que:
- el radioinmunoconjugado sobregula la expresión del antígeno de un antígeno expresado en la superficie de las células cancerosas de células B,
 - 20 - el antígeno infraregulado es CD20,
 - la sobregulación es seguida por la terapia con anticuerpos anti-CD20 en una sola administración o en un patrón de administración repetida, y
 - 25 - la administración de anticuerpo anti-CD20 es de al menos un día a 15 días después de la administración de radioinmunoconjugado.
- 30 2. El anticuerpo radioinmunoconjugado y anti-CD20 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la administración de anticuerpo anti-CD20 es de 3 - 15 días después de la administración de radioinmunoconjugado.
- 35 3. El anticuerpo radioinmunoconjugado y anti-CD20 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que la administración se realiza por infusión intravenosa o inyección intravenosa.
4. El anticuerpo radioinmunoconjugado y anti-CD20 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que la dosificación es de 10-100 MBq/kg de peso corporal.
- 40 5. El anticuerpo radioinmunoconjugado y anti-CD20 para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo monoclonal radiomarcado se selecciona del grupo que consiste en HH1, HH1 quimérico, HH1 humanizado, chHH1.1 o chHH1.3.
- 45 6. El anticuerpo radioinmunoconjugado y anti-CD20 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el conector es un conector quelante seleccionado del grupo que consiste en p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-éster, p-SCN- Bn-DTPA y CHX-A''-DTPA.
- 50 7. El anticuerpo radioinmunoconjugado y anti-CD20 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el radioinmunoconjugado se formula como una composición farmacéutica.
8. El anticuerpo radioinmunoconjugado y anti-CD20 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la composición farmacéutica comprende uno o más vehículos o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

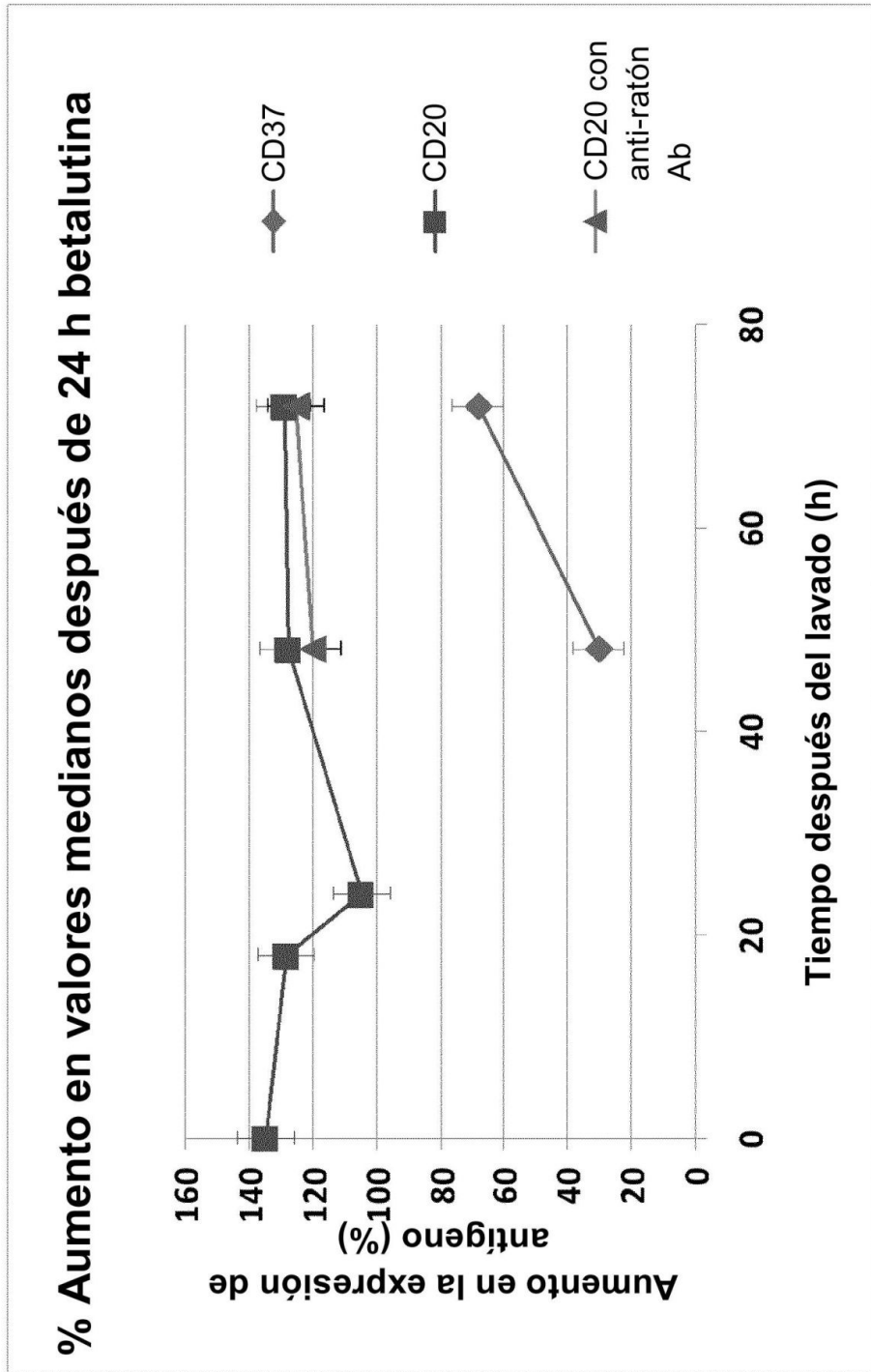


Fig. 1

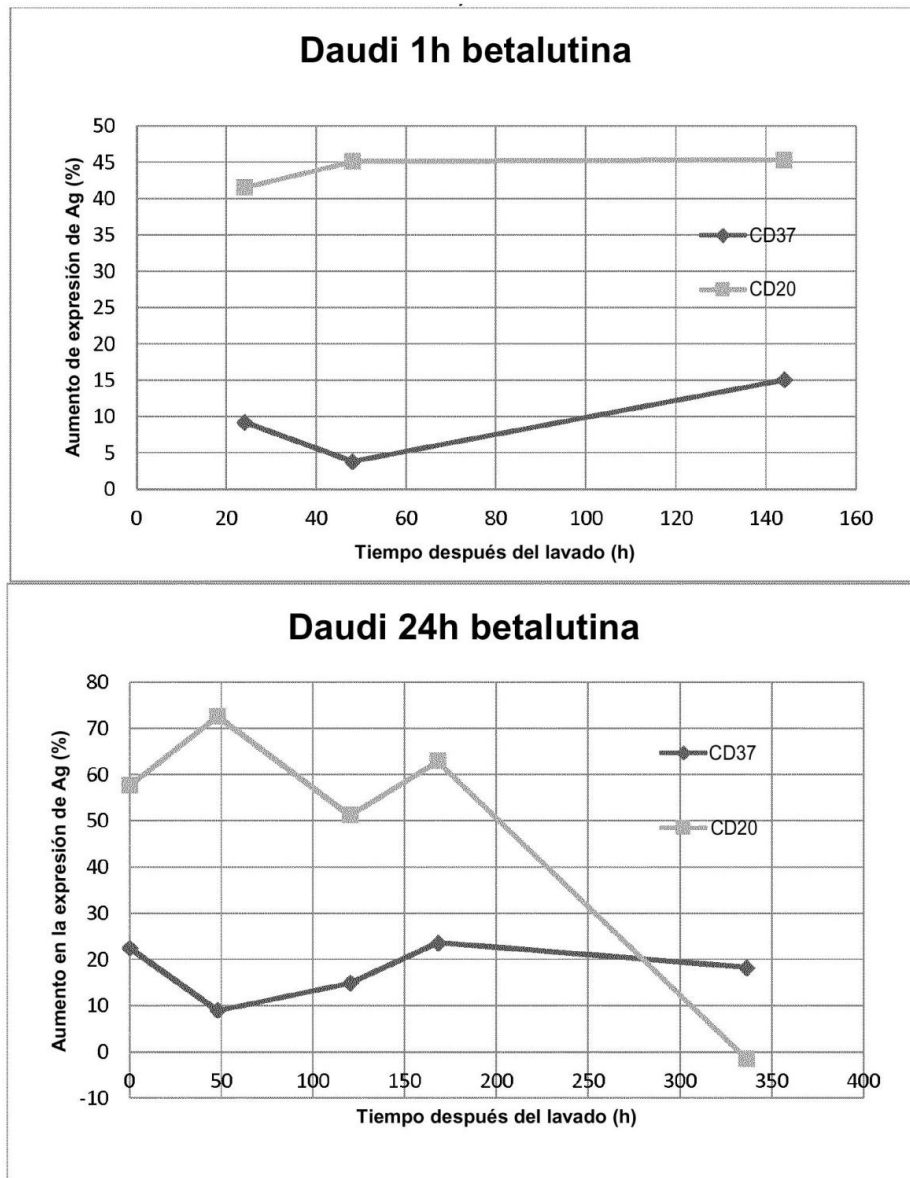


Fig. 2

Tabla 1

Línea celular	Tiempo después del final del tratamiento	% de aumento en la expresión de antígeno	
		CD20	CD37
Daudi	48 h	45,1	3,8
	144 h	48,8	15,1
Raji	48 h	18,6	21,0
Ramos	168 h	15,0	66,0
Rec-1	48 h	16,7	0

Fig. 3

Tabla 2

Línea celular	Tiempo de incubación	Tiempo después del final del tratamiento	% de aumento en la expresión de antígeno	
			CD20	CD37
Daudi	1 h	144 h	5,9	22,0
	24 h	48 h	51,8	37,1
Raji	1 h	168 h	63,4	49,3

Fig. 4

Tabla 3

Línea celular	¹⁷⁷ Lu-HH1 frente a DOTA-HH1 (%)				¹⁷⁷ Lu-HH-1 frente a tampón de formulación (%)			
	4 días	8 días	11 días	15 días	4 días	8 días	11 días	15 días
Daudi	60	42	3	ND	46	27	7	4
JMV-3	45	79	52	33	48	99	48	9

ND- No determinado.

Fig. 5

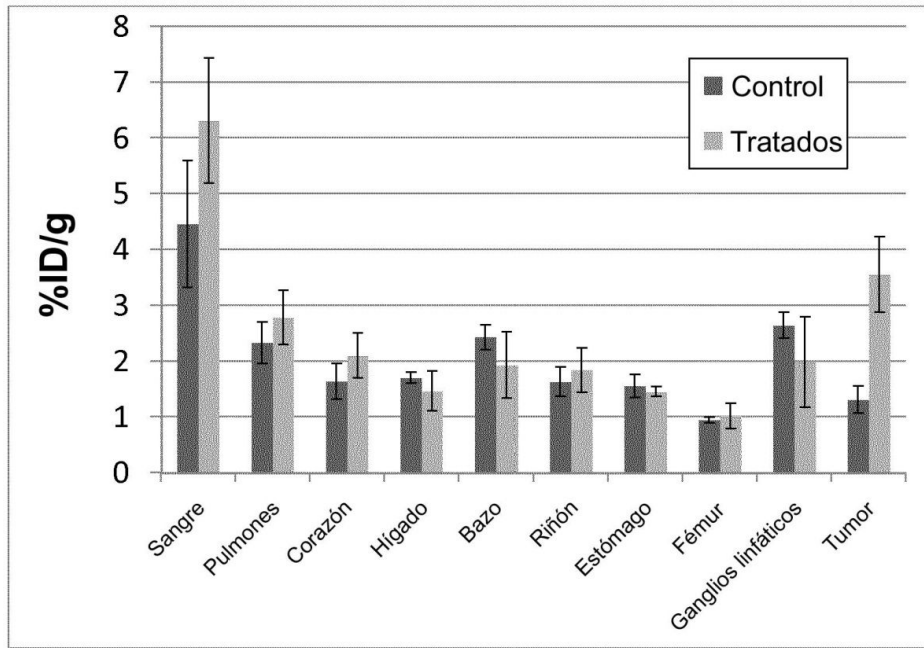


Fig. 6