

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 572**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2014 PCT/EP2014/053420**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014 E 14706543 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2958589**

54 Título: **Tratamiento del cáncer basado en la estratificación de CAIX**

30 Prioridad:

22.02.2013 US 201361768084 P

31.05.2013 US 201361829349 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2019

73 Titular/es:

HEIDELBERG PHARMA AG (100.0%)

Schriesheimer Strasse 101

68526 Ladenburg, DE

72 Inventor/es:

WILHELM, OLAF;

BEVAN, PAUL;

FALL, BARBARA y

KLÖPFER, PIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 703 572 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

Tratamiento del cáncer basado en la estratificación de CAIX

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CAIX (anhidrasa carbónica IX) para el uso en el tratamiento del carcinoma de células claras renales (ccRCC), en el que el uso comprende cuantificar la expresión de CAIX, así como la determinación de una puntuación de CAIX basada en la expresión de CAIX.

La proteína transmembrana anhidrasa carbónica IX (CAIX) es un miembro de la gran familia de enzimas anhidrasas carbónicas, que comparten la capacidad de catalizar la hidratación reversible de dióxido de carbono en ácido carbónico, lo que conduce a una disminución del pH (Opavsky R, et al., Genomics 1996, 33: 480-487). La estimulación de la expresión génica de CAIX se da en respuesta a la hipoxia por medio de la activación transcripcional directa mediante el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α), y se cree que está implicada en la detección y el mantenimiento del medio ácido de las células hipóxicas, en particular en las regiones hipóxicas de los tumores (Wykoff et al., Cancer Res 2000, 60: 7075-7083; Svastova et al., FEBS Letters 2004 577: 439-445).

El antígeno G250 está estrechamente asociado a numerosos carcinomas, tales como el carcinoma de células renales. El antígeno G250 se describió primero como un antígeno asociado al cáncer renal (documento WO 88/08854). Más tarde, se descubrió que era idéntico al antígeno MN asociado a tumores, un antígeno de la superficie celular con actividad de anhidrasa carbónica, también denominado CAIX.

Se halla una expresión normal de CAIX en la mucosa gástrica, intestinal y biliar, donde su papel fisiológico reside en la regulación del pH. Además de su patrón de expresión normal, se halla una expresión de CAIX en una diversidad de tumores, que incluyen carcinomas cervicales, esofágicos, colorrectales, pulmonares, pancreáticos, biliares y de células claras renales (RCC).

Los anticuerpos hacia CAIX, por lo tanto, se pueden emplear para la terapia del cáncer. Los anticuerpos anti-G250 se describen, por ejemplo, en los documentos EP 637 336, WO 93/18152, WO 95/34650, WO 00/24913, WO 02/063010, WO 04/025302, WO 05/037083, WO 2011/139375 y los equivalentes extranjeros de los mismos. Además, el documento WO 02/062972 describe una línea celular de hibridoma DSM ACC 2526 que produce el anticuerpo monoclonal G250. El anticuerpo monoclonal G250 reconoce un antígeno expresado preferiblemente en las membranas de las células del carcinoma de células renales (RCC), pero no expresado en el epitelio tubular proximal normal. El anticuerpo G250 se une al antígeno G250, que también se denomina antígeno MN (véase, por ejemplo, el documento WO 93/18152) o CAIX (anhidrasa carbónica IX).

Un comunicado de prensa de Wilex AG del 16-10-2012 informó de los resultados del ensayo ARISER de fase III, en el que se usó Girentuximab para tratar el carcinoma de células claras renales (ccRCC). El ensayo no cumplió su criterio de valoración principal.

Una persona experta en la técnica conoce los métodos para la determinación de la expresión de CAIX, e incluyen, pero sin limitación, la tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido que se describe, p.ej., en Bui et al., Clinical Cancer Research 2003, 9: 802-811, Atkins et al., Clin. Cancer Res 2005, 11: 3714-3721, documentos US 5.989.838, US 6.004.535, US 6.093.548, US 7.524.634, US 7.851.455. Tales métodos se pueden usar en el pronóstico del carcinoma humano de células claras renales.

El objetivo de la presente invención fue proporcionar métodos que hicieran posible caracterizar adicionalmente un cáncer asociado a CAIX y predecir el grado de eficacia que tendría un tratamiento con un compuesto dirigido hacia CAIX. Según la presente invención, este objetivo se consigue mediante el uso de una puntuación de CAIX específica en el tratamiento y la clasificación del cáncer como se define en las reivindicaciones.

Así, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CAIX (anhidrasa carbónica IX) para el uso en el tratamiento del carcinoma de células claras renales (ccRCC), en el que el uso comprende cuantificar la expresión de CAIX en al menos una muestra tumoral proporcionada a partir de un sujeto a tratar, determinar una puntuación de CAIX basándose en la expresión de CAIX en la muestra tumoral, y el sujeto se trata si se alcanza una puntuación de CAIX $\geq 2,6$, en el que la expresión de CAIX se cuantifica mediante tinción inmunohistoquímica, y en el que la puntuación de CAIX se determina y/o calcula mediante la fórmula:

Puntuación de CAIX = (0 x porcentaje de células tumorales viables sin intensidad de tinción) + (1 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción débil) + (2 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción moderada) + (3 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción fuerte).

Con respecto a la presente invención, la puntuación de CAIX se determina, o se calcula, respectivamente, basándose en la expresión de CAIX descrita mediante una combinación de la extensión de las células tumorales y la intensidad de la tinción. En otras palabras, la cantidad/porcentaje de células tumorales que expresan el antígeno de CAIX, así como la intensidad de la tinción de las células tumorales teñidas, se consideran en la puntuación de CAIX usada en la presente memoria. Se puede considerar que la expresión de CAIX es una medida de la densidad del antígeno, preferiblemente una medida de la densidad del polipéptido de CAIX en el tejido tumoral del paciente que padece el cáncer a tratar, en el que el cáncer es ccRCC. La puntuación de CAIX es un valor que describe la cantidad

de inmunorreactividad de un marcador, tal como CAIX, en una muestra. La puntuación considera tanto la intensidad de la tinción como el porcentaje de células teñidas en un intervalo específico de intensidades. La puntuación se determina sumando los productos de los porcentajes de células teñidas a una intensidad de tinción concreta (0-100) en una muestra (tal como un corte de tejido de un cáncer ccRCC) y la intensidad de la tinción (0-3). Preferiblemente, la puntuación se puede producir para un compartimento específico, por ejemplo citoplasma, membrana, núcleo.

Según la invención, la puntuación de CAIX se determina y/o se calcula mediante la fórmula

Puntuación de CAIX = (0 x porcentaje de células tumorales viables sin intensidad de tinción) + (1 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción perceptible débil) + (2 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción moderada) + (3 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción fuerte). Por ejemplo, una muestra con un 10% de intensidad de tinción de 1, 20% de intensidad de tinción de 2 y 20% de tinción de 3 y 20% de células sin teñir tiene una puntuación de (1 x 10) + (2 x 20) + (3 x 20) + (0 x 50) = 110, o si se calcula (1 x 10/100) + (2 x 20/100) + (3 x 20/100) + (0 x 50/100) = 1,1.

La puntuación de CAIX puede tener cualquier valor entre 0 (sin tinción) y 3 (100% de células tumorales viables con una graduación de intensidad de 3+).

En el contexto de la presente invención, la "extensión de células tumorales" o la cantidad de células tumorales que expresan el antígeno de CAIX se considera en la fórmula de puntuación de CAIX según la presente invención mediante la indicación de la proporción en porcentaje de células tumorales viables y su intensidad de tinción. Las células tumorales viables se pueden contar o determinar mediante métodos conocidos para una persona experta en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar el número de células y/o la proporción respectiva en porcentaje mediante recuento visual o programas informáticos, tal como un sistema automático de formación de imágenes.

La extensión de células tumorales como parte de la puntuación de CAIX se gradúa en un factor de graduación de cuatro niveles (0, 1+, 2+ y 3+). El factor de graduación 0 se obtiene de la tinción de CAIX comparable a las muestras de control, y representa la ausencia de expresión de CAIX. Los factores de graduación 1+ a 3+ se obtienen de una muestra media de células tumorales que expresan CAIX, que muestran una tinción de células tumorales de escasamente perceptible a fuerte. Normalmente, un histólogo o patólogo de experiencia media en la técnica puede hacer la clasificación mediante un análisis convencional a simple vista (Cregger et al., Arch. Pathol. Lab. Med., 2006, 130: 1026-1030). El valor absoluto de la intensidad de la tinción puede depender, p.ej., del reactivo de tinción aplicado, del tejido tumoral a teñir, etc. Sin embargo, entre otros, este problema se puede superar mediante el uso del sistema de graduación anterior, que comprende grados de +1 a +3.

La intensidad de tinción en las células tumorales se incrementa de manera casi proporcional desde una tinción escasamente perceptible hasta una tinción fuerte. A lo largo de este incremento lineal de la intensidad de tinción, las células tumorales que expresan CAIX se dividen en tres grupos que tienen una graduación de 1+ a 3+, y el incremento respectivo de la intensidad de tinción es el mismo para cada grupo. En otras palabras, las células tumorales viables se separan en células con una intensidad de tinción débil o escasamente perceptible (graduación 1+), una intensidad de tinción moderada (2+) y una intensidad de tinción fuerte (3+).

Una vez que se ha establecido un sistema de puntuación para un agente de tinción específico y células tumorales específicas en una muestra media de células tumorales que definen un sistema de referencia, se puede usar para las muestras adicionales de células tumorales, es decir, el sistema de puntuación de CAIX respectivo, por supuesto, no se tiene que establecer para cada muestra de células tumorales.

"Intensidad de tinción", según la presente invención, significa el porcentaje de células tumorales en cada factor de graduación de cuatro niveles. El porcentaje puede ser cualquiera entre 0% y 100%. La intensidad de la tinción se determina como el porcentaje de células tumorales que muestran una tinción de membrana débil o escasamente perceptible para la graduación +1, como el porcentaje de células tumorales que muestran una tinción de membrana moderada para la graduación +2, como el porcentaje de células tumorales que muestran una tinción de membrana fuerte para la graduación +3 para cada muestra de tejido (Tabla 1).

Tabla 1: Intensidad de tinción

	Graduación
% de células tumorales que mostraron una tinción de membrana débil / escasamente perceptible	1+
% de células tumorales que mostraron una tinción de membrana moderada	2+
% de células tumorales que mostraron una tinción de membrana fuerte	3+

La clasificación de las células tumorales que expresan CAIX en el grupo de graduación respectivo se puede hacer fácilmente comparando la intensidad de tinción de la muestra con la muestra tumoral de referencia en la que se basó

el sistema de puntuación de CAIX. Así, es posible que las muestras de células tumorales no incluyan los tres grupos de graduación.

5 Una persona de experiencia media en la técnica conoce los métodos para la determinación de la intensidad de tinción, para definir un sistema de puntuación o para comparar diferentes muestras de células o clasificar las células en un sistema de puntuación con el fin de comparar la intensidad de la tinción (véase Cregger et al., 1026, Arch. Pathol. Lab. Med., vol. 130, julio de 2006). La determinación de la intensidad de tinción o la clasificación en un sistema de puntuación se puede llevar a cabo manualmente o por medio de un programa informático o cualquier otro método adecuado. En una realización preferida, el sistema de puntuación se aplica mediante el uso de ensayos estandarizados con tumores de control en combinación con un dispositivo que proporciona resultados cuantitativos y objetivos.

10 A continuación se mostrará un ejemplo de cálculo de la puntuación de CAIX para una extensión de la expresión del antígeno de CAIX del 100% con una intensidad de tinción moderada del 40% y fuerte del 60%. En la Tabla 2 se muestran ejemplos adicionales para diferentes extensiones de la expresión de CAIX, un contenido diferente de intensidad de tinción y las puntuaciones respectivas.

15 Cálculo de la puntuación de CAIX:

Extensión de la expresión del antígeno de CAIX del 100% con una intensidad de tinción moderada del 40% y fuerte del 60%

$$(1*(0/100))+(2*(40/100))+(3*(60/100))$$

$$0 + 0,8 + 1,8 = 2,6$$

20 Tabla 2

extensión de la expresión de CAIX	1+	2+	3+	Puntuación
100	0	40	60	2,60
100	10	60	30	2,20
100	5	25	70	2,65
100	50	30	20	1,70
100	0	10	90	2,90
10	0	100	0	0,20
10	100	0	0	0,10
50	100	0	0	0,50
50	30	30	40	1,05
50	50	30	20	0,85
50	20	70	10	0,95
50	70	20	10	0,70

Según la presente invención, la puntuación de CAIX se basa en la expresión de CAIX que se tiene que determinar. En la presente memoria, los términos expresión de CAIX y expresión de la proteína CAIX se pueden usar de manera intercambiable. Preferiblemente, el término expresión de CAIX se refiere a la cantidad de proteína CAIX expresada.

25 El tratamiento de ccRCC comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CAIX al paciente si se ha descubierto que el ccRCC del paciente tiene una puntuación de CAIX igual o mayor de 2,6.

De ese modo, se cuantifica la CAIX expresada, si la hay, presente en una o más muestras obtenidas de un sujeto a tratar. Preferiblemente, la muestra obtenida del sujeto a tratar es una muestra de tejido del ccRCC a tratar.

30 La CAIX expresada se cuantifica mediante tinción inmunohistoquímica, preferiblemente tinción inmunohistoquímica en la que la proteína CAIX o el polipéptido CAIX se une de manera específica a un anticuerpo monoclonal, más preferiblemente a un anticuerpo monoclonal con un dominio de unión al epítipo en el extremo N-terminal de CAIX, aún más preferiblemente al anticuerpo monoclonal M75, lo más preferiblemente al anticuerpo monoclonal que secreta el hibridoma VU-M75 que tiene el nº de acceso de la ATCC HB 11128. Una persona experta en la técnica conoce los métodos adecuados para la tinción inmunohistoquímica. Los kits de tinción inmunohistoquímica están

disponibles comercialmente, e incluyen, pero sin limitación, el kit CAIX IHC ofrecido por Oncogene Science 100 Acorn Park Drive, Cambridge, MA 02140, EE.UU. Otro ejemplo de método de tinción inmunohistoquímica se describe, p.ej., en el documento EP 1 501 939 B1. La tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido se puede realizar con un anticuerpo anti-CAIX mediante el uso de una técnica de peroxidasa con recuperación del antígeno mediante el uso de un tratamiento térmico, como se describe en los sistemas de tinción de Dako (Dako Corporation, Carpintería, CA). Los anticuerpos usados en el inmunoensayo y/o la tinción inmunohistoquímica pueden ser policlonales o monoclonales. Preferiblemente, se usan anticuerpos monoclonales. En el método de tinción inmunohistoquímica según la presente invención se pueden usar anticuerpos marcados o sin marcar. Los medios de detección con marcaje incluyen marcadores que pueden comprender medios fluorescentes, enzimas, coenzimas, radionucleótidos, medios quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Los ensayos respectivos incluyen inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos fluorescentes, radioinmunoensayos, ELISAS, etc. Los anticuerpos de detección de utilidad en la tinción inmunohistoquímica del tejido incluyen los anticuerpos monoclonales M75, MN9, MN12, MN7. Un anticuerpo de detección que se usa preferiblemente según la presente invención es M75. El anticuerpo M75 se describe adicionalmente en el documento US 5.981.711, y es parte del kit CAIX IHC ofrecido por Oncogene Science (véase anteriormente). Se prefieren en particular los métodos de tinción que proporcionan resultados medibles y/o comparables, tales como la intensidad de colorante, intensidad fluorescente, señales radiactivas, actividad enzimática, etc.

Según una realización preferida, la CAIX expresada comprende un polipéptido de CAIX o fragmento de polipéptido de CAIX. Según otra realización preferida, la CAIX expresada comprende un mRNA que codifica un polipéptido de CAIX o fragmento de polipéptido de CAIX. Una persona experta en la técnica conoce los métodos para la determinación de la cantidad de mRNA en una muestra de una célula, tales como transferencia de Northern, microensayos, PCR en tiempo real, etc.

Según la invención, el sujeto se tratará si la puntuación de CAIX en la muestra tumoral obtenida del sujeto es $\geq 2,6$. Un análisis de todas las puntuaciones de CAIX posibles de 0,0 a 3,0 revela que cuanto más se incremente la puntuación de CAIX más significativo será el efecto del tratamiento. Los pacientes que tienen una puntuación de CAIX de $\geq 2,6$ muestran un efecto de tratamiento estadísticamente significativo cuando se tratan con un anticuerpo anti-CAIX, en particular un anticuerpo anti-G250. Preferiblemente, la muestra tumoral obtenida del sujeto es al menos una muestra de tejido obtenida del ccRCC del sujeto a tratar. El anticuerpo anti-CAIX interacciona de manera específica con un polipéptido de CAIX. Interaccionar de manera específica (p.ej. reconocer o unirse a) significa que el anticuerpo anti-CAIX tiene una afinidad mayor hacia CAIX que hacia otros polipéptidos. En una realización, el anticuerpo anti-CAIX interacciona con (es decir, se une o reconoce) o modula la actividad de un polipéptido de CAIX y/o actúa como mediador en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad mediada por el complemento (CDC). Así, según una realización, el anticuerpo es un inhibidor de CAIX que actúa sobre el nivel de la proteína. Los ejemplos de anticuerpos anti-CAIX o anticuerpos hacia CAIX se describen en los documentos EP 637 336, WO 93/18152, WO 95/34650, WO 00/24913, WO 02/063010, WO 04/025302, WO 05/037083, WO 2011/139375, Murri-Plesko et al., Eur J Pharmacol 2011, 657: 173-183.

En una realización preferida, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión al antígeno de los mismos tales como $F(ab')_2$, Fab', sFv, dsFv y las variantes quimerizadas, humanizadas y completamente humanas del mismo. Según una realización preferida adicional, este anticuerpo anti-CAIX o fragmento de unión al epítipo del mismo se une a la secuencia de aminoácidos LSTAFARV y/o ALGPGREYRAL.

Según una realización especialmente preferida adicional, el compuesto dirigido hacia CAIX es el anticuerpo anti-G250 y/o un fragmento de unión al epítipo del mismo. Los anticuerpos anti-G250 se describen, p.ej., en el documento EP-B-0 637 336. Se prefiere especialmente que el anticuerpo anti-tumoral sea el anticuerpo G250 quimérico o humanizado y/o un fragmento del mismo. Los anticuerpos para el uso en la presente invención se pueden producir mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, lo que incluye, pero sin limitación, mediante métodos como los descritos en los documentos PCT/EP02/01282 y PCT/EP02/01283.

Un anticuerpo especialmente preferido es cG250, preferiblemente girentuximab (INN). Otra realización especialmente preferida es el anticuerpo monoclonal G250 producido por la línea de células de hibridoma DSM ACC 2526. El anticuerpo cG250 es una versión quimérica de la cadena ligera kappa de IgG1 de un anticuerpo monoclonal inicialmente murino mG250.

El cáncer a tratar es un ccRCC que se caracteriza por expresar CAIX. En particular, el cáncer se caracteriza por tener una puntuación de CAIX $\geq 2,6$, como se indicó anteriormente.

En la realización más preferida de la presente invención, el carcinoma de células claras renales se trata administrando el anticuerpo G250, y en particular cG250, preferiblemente girentuximab.

Se prefiere que al sujeto a tratar se le haya diagnosticado un tipo no metastásico de cáncer o enfermedad no metastásica, más preferiblemente un tipo no metastásico de cáncer o enfermedad no metastásica, y/o que se le haya diagnosticado un riesgo elevado de recidiva.

Según una realización adicional, el anticuerpo anti-CAIX, y en particular el anticuerpo anti-G250, se va a usar después de que el sujeto a tratar se haya sometido a una extirpación del tumor primario, preferiblemente una nefrectomía tumoral, más preferiblemente una nefrectomía tumoral y linfadenectomía. Preferiblemente, este tumor primario es un carcinoma de células claras renales que expresa el antígeno G250 (ccRCC).

- 5 Por lo tanto, en una realización preferida adicional, el anticuerpo anti-CAIX, y en particular el anticuerpo anti-G250, se usa como terapia adyuvante. Desde el punto de vista de la presente invención, la terapia adyuvante describe una manera de seleccionar como objetivo cualquier célula cancerosa restante que no se puede detectar. Las terapias adyuvantes se usan normalmente después de los tratamientos primarios, tales como cirugía o radiación, para proteger de cualquier recidiva del cáncer. Un ejemplo de terapia adyuvante es el tratamiento adicional administrado normalmente tras la cirugía, en el que se ha eliminado la totalidad de la enfermedad detectable, pero en el que sigue existiendo un riesgo estadístico de recidiva debido a la enfermedad oculta. Los tipos de terapia adyuvante comprenden la quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia y/o inmunoterapia. Por ejemplo, habitualmente se administra radioterapia o terapia sistémica como tratamiento adyuvante tras la cirugía del cáncer de mama. La terapia sistémica puede consistir en quimioterapia, inmunoterapia o terapia con modificadores de la respuesta biológica o terapia hormonal. Preferiblemente, si se usa el anticuerpo anti-CAIX según la presente invención, se puede combinar una terapia adyuvante con cualquiera de estos tipos de terapias adyuvantes conocidas.

Un aspecto adicional del presente documento se refiere a un método para diagnosticar, pronosticar y/o clasificar una un cáncer, que comprende

- (a) cuantificar la expresión de CAIX en una muestra de cáncer mediante tinción y
 20 (b) clasificar el cáncer según la extensión e intensidad de la tinción de las células cancerosas teñidas.

El método de diagnóstico puede comprender además la determinación de una puntuación de CAIX como se describió anteriormente.

El cáncer a diagnosticar y/o clasificar es un cáncer como se describió anteriormente, concretamente carcinoma de células claras renales. Este cáncer tiene una puntuación de CAIX $\geq 2,6$.

- 25 El pronóstico incluye el uso de la puntuación de CAIX para predecir si un paciente a tratar respondería o no al tratamiento con un anticuerpo anti-CAIX, en particular al tratamiento con un anticuerpo anti-G250. Se usa especialmente para predecir si un paciente respondería al tratamiento con el anticuerpo cG250, preferiblemente con girentuximab. En otras palabras, se puede pronosticar qué pacientes se beneficiarán probablemente de un tratamiento con compuestos dirigidos hacia CAIX. Por ejemplo, los pacientes que tienen carcinoma de células claras renales, en los que la muestra de células tumorales correspondiente muestra una puntuación de CAIX $\geq 2,6$, se beneficiarán muy probablemente de un tratamiento con el anticuerpo cG250, preferiblemente girentuximab.

Los pacientes en un estadio T alto (T3/T4), un grado bajo (G1/G2), sin implicación de nódulos linfáticos (N0/NX) y sin enfermedad metastásica (M0) tienen un peor pronóstico, con una puntuación de CAIX baja en comparación con los pacientes con una puntuación de CAIX alta.

- 35 Un aspecto adicional del presente documento se refiere a un método para el tratamiento del ccRCC, y dicho método comprende
- (a) definir la expresión de una CAIX en una célula cancerosa derivada de ccRCC obtenida de un sujeto a tratar mediante tinción,
- (b) determinar una puntuación de CAIX según la extensión e intensidad de la tinción de las células cancerosas y
- 40 (c) administrar un anticuerpo anti-CAIX si en la etapa (b) se ha superado un valor umbral de CAIX predefinido.

El anticuerpo anti-CAIX, y en particular el anticuerpo anti-G250, se puede administrar en un protocolo de monoterapia.

- El anticuerpo anti-CAIX, y en particular el anticuerpo anti-G250, preferiblemente el anticuerpo cG250, más preferiblemente girentuximab, también se puede administrar en un protocolo de terapia de combinación o en forma de una terapia de combinación, p.ej., como ya se resumió anteriormente, y un tratamiento con anticuerpo anti-G250 adyuvante se puede combinar con cualquier otro tipo de terapia adyuvante. Se puede co-administrar una citocina junto con el anticuerpo para incrementar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para activar el sistema inmunitario del paciente, p.ej., las células NK. Esta citocina se puede seleccionar del grupo que consiste en interleucinas tales como IL-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14, y -15, interferón, p.ej., IFN- α , IFN- β , e IFN- γ , TNF- α , TNF- β , factor de crecimiento nervioso, ligandos de CD40, Fas, CD27 y CD30, proteína inhibidora de macrófagos, Rantes, fragmentos activos de análogos y derivados farmacéuticamente aceptables, y mezclas de los mismos. Más preferiblemente, la citocina se selecciona de IL-2 e IFN- α . Por supuesto, es posible una combinación con medios citotóxicos adicionales, p.ej., doxorubicina, cis-platino o carboplatino y otros medios neoplásicos.

El técnico de experiencia habitual puede determinar la dosis del anticuerpo anti-CAIX usado, y en particular del

- 5 anticuerpo específico del antígeno G250, basándose en la edad, peso, estado y gravedad de la enfermedad, por ejemplo. Un régimen de dosis de 20 mg o 50 mg de anticuerpo cG250, por ejemplo, por paciente en un ciclo semanal suministrará concentraciones superiores a 0,5 µg/ml, preferiblemente 1 µg/ml, y por lo tanto debería tener una eficacia adecuada. Por lo tanto, se puede administrar una dosis semanal del anticuerpo específico de G250 de 5-250 mg/semana, preferiblemente 10-100 mg/semana, y más preferiblemente 20 mg/semana a 50 mg/semana.
- Se puede administrar el anticuerpo específico del antígeno G250 y/o un fragmento de anticuerpo del mismo a un sujeto que lo necesita en al menos dos etapas de tratamiento, en las que se administran cantidades del anticuerpo diferentes, preferiblemente decrecientes.
- 10 El método anteriormente descrito puede comprender la administración de un anticuerpo específico hacia el antígeno G250 y/o un fragmento de anticuerpo del mismo a un sujeto que lo necesita en dos etapas, en las que
- (a) se administra una dosis de 10-250 mg/semana, preferiblemente 20-100 mg/semana, más preferiblemente 30-100 mg/semana, aún más preferiblemente 30-55 mg/semana y lo más preferiblemente 50 mg/semana del anticuerpo específico del antígeno G250 en la primera etapa de tratamiento, y
- 15 (b) se administra una dosis de 5-100 mg, preferiblemente 10-50 mg, más preferiblemente 15-25 mg, lo más preferiblemente 20 mg/semana del anticuerpo específico del antígeno G250 en la segunda etapa de tratamiento.
- Se prefiere aún más que la primera etapa de tratamiento comprenda la administración de 50 mg/semana del anticuerpo específico hacia G250, y la segunda etapa de tratamiento comprenda la administración de 20 mg/semana.
- 20 El anticuerpo antitumoral se administra preferiblemente de manera intravenosa, preferiblemente mediante infusión o inyecciones intravenosas. La administración del anticuerpo mediante infusión se lleva a cabo preferiblemente en hasta alrededor de 30 minutos, más preferiblemente en alrededor de 15 minutos. Por supuesto, el compuesto dirigido hacia CAIX también se puede aplicar de manera intraperitoneal o intramuscular.
- 25 Los esquemas de dosis con infusiones semanales de 20 o 50 mg de anticuerpo cG250 durante hasta 20 semanas parecen tolerarse bien y no parecen conducir a un desarrollo de HACA significativo.
- Por lo tanto, se prefiere que la primera etapa de tratamiento comprenda hasta 12 semanas, preferiblemente hasta 6 semanas, aún más preferiblemente hasta una semana, y la segunda etapa de tratamiento comprenda hasta 156 semanas, preferiblemente hasta 104 semanas, más preferiblemente hasta 52 semanas, aún más preferiblemente hasta 12-24 semanas.
- 30 Lo más preferiblemente, la primera etapa de tratamiento comprende hasta una semana y la administración de una única dosis de carga de 50 mg/semana de anticuerpo cG250, y la segunda etapa de tratamiento comprende hasta 24 semanas y la administración de 20 mg/semana de anticuerpo cG250 para el tratamiento del carcinoma de células claras renales.
- 35 La primera etapa de tratamiento puede comprender hasta una semana y la administración de una única dosis de carga de 50 mg/semana de anticuerpo cG250 de manera intravenosa, y la segunda etapa de tratamiento puede comprender hasta 24 semanas y la administración de 20 mg/semana de anticuerpo cG250 para el tratamiento del carcinoma de células claras renales, preferiblemente la segunda etapa de tratamiento comprende al menos 8 administraciones intravenosas consecutivas de 20 mg/semana de anticuerpo cG250 para el tratamiento del carcinoma de células claras renales.
- 40 El anticuerpo anti-CAIX, en particular el anticuerpo cG250, por supuesto, se puede administrar en una composición farmacéutica. Esta composición farmacéuticamente aceptable puede comprender vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables. El término "vehículo", cuando se usa en la presente memoria, incluye vehículos, excipientes y/o estabilizantes que son atóxicos para la célula o mamífero que se expone a ellos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo los vehículos fisiológicamente aceptables son disoluciones acuosas de pH tamponado o
- 45 liposomas. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; anti-oxidantes que incluyen ácido ascórbico, polipéptidos de peso molecular bajo (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinil pirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas, agentes gelificantes
- 50 tales como EDTA, azúcares, alcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietileno o polietileno glicol.
- En un aspecto, el anticuerpo anti-CAIX se administra en solución salina normal (0,9% de cloruro sódico estéril en agua).
- 55 Según un aspecto particular, el anticuerpo cG250 se administra en solución salina normal mediante infusión intravenosa, p.ej., 100 ml de solución a lo largo de 15 min.

Las expresiones "anhidrasa carbónica IX" y "CAIX", "CA9", "MN" y "G250" se consideran sinónimas en la presente memoria.

"cG250" y girentuximab se usan de manera intercambiable.

5 "Antígeno" se refiere a un ligando que se puede unir, p.ej., a un anticuerpo. Las porciones del antígeno que hacen contacto con el anticuerpo se denominan "epítomos".

Si no se menciona de otra manera, la "tinción", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier método que hace visibles las células tumorales. El método de "tinción" usado según la invención es la tinción inmunohistoquímica como se describió anteriormente.

Leyenda de las Figuras

10 Figura 1: CR (cociente de riesgo) y valores de p para valores de puntuación de CAIX crecientes para las poblaciones ITT (intención de tratar) y PP (población por protocolo)

Figura 2: SSE por rama de tratamiento (cG250 frente a Placebo) para umbral de CAIX de 2,6

Figura 3: Curva de SSE para la población PP con puntuaciones de CAIX $\geq 2,6$

Figura 4: Puntuación de CAIX elevada ($\geq 2,0$) y edad < 65 años (población ITT)

15 Ejemplos

Los resultados siguientes se basan en un estudio de fase III de doble enmascaramiento aleatorizado para evaluar el tratamiento adyuvante con cG250 frente a placebo en pacientes con carcinoma de células claras renales (ccRCC) y riesgo elevado de recidiva.

Objetivos:

20 Los objetivos de este estudio fueron determinar la supervivencia sin enfermedad (SSE) en la terapia con girentuximab en comparación con el placebo, y determinar la supervivencia total (ST) en la terapia con girentuximab en comparación con el placebo.

Pacientes:

25 Se incorporaron 864 pacientes (ITT) en un estudio prospectivo, de dos ramas, aleatorizado, con enmascaramiento doble, controlado con placebo. La evaluación de la supervivencia sin enfermedad fue establecida por un Comité de Revisión Radiológica independiente. 855 pacientes recibieron al menos un tratamiento de estudio (cG250 o placebo) y se analizó en ellos la seguridad por parte de un Comité de Monitorización de Datos independiente. Los criterios de inclusión para los pacientes fueron: edad ≥ 18 años, nefrectomía anterior (parcial o total) de carcinoma primario de células renales con histología documentada de células claras, sin indicios de enfermedad residual macroscópica ni microscópica. Los pacientes debían pertenecer a uno de los siguientes grupos de riesgo elevado (RG) (relativos a la clasificación TNM, 6ª edición UICC, 2002):

- 30 ○ RG I: T3aN0/XM0 o T3bN0/XM0 o T3cN0/XM0 o T4N0/XM0
- RG II: cualquier enfermedad en estadio T y N+ y M0
- 35 ○ RG III: T1bN0/XM0 o T2N0/XM0, cada uno con una clasificación $G \geq 3$ (Fuhrman o cualquier otro sistema de clasificación nuclear con al menos 3 grados),

no más de 12 semanas entre la fecha de nefrectomía y la aleatorización, ECOG de 0 a 1.

Medicación de estudio:

40 Se aplicó girentuximab (cG250; una versión quimérica de la cadena ligera kappa de IgG1 de un anticuerpo monoclonal mG250 murino original) en una única dosis de carga de 50 mg (semana 1), seguido de infusiones semanales de 20 mg de girentuximab (semanas 2-24). El fármaco se diluyó en 100 ml de solución salina normal (0,9% de cloruro sódico estéril en agua) y se aplicó mediante una infusión intravenosa a lo largo de 15 minutos. El grupo de placebo recibió solución salina tamponada con fosfato con polisorbato 20 (Tween® 20) sin ingrediente activo. La duración del tratamiento fue de 24 semanas.

Inmunohistoquímica:

45 Se cortaron muestras de tejido de nefrectomía incrustadas en parafina en cortes de 3-5 μm y se recogieron sobre los portaobjetos adhesivos respectivos. La desparafinación y deshidratación se realizó con una mezcla EZ Prep de Ventana Medical Systems, Inc. El material tisular se bloqueó y se tiñó con una disolución del anticuerpo diluido (CAIX M75, 1:150). El anticuerpo se detectó mediante el uso de un anticuerpo IgG biotinilado anti-IgG de ratón

(Ventana Medical Systems, Inc.) seguido de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (Ventana Medical Systems, Inc.). La detección de la señal se realizó con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno (Ventana Medical Systems, Inc.). Se incluyeron controles de tejidos positivos y negativos como referencia.

Métodos Estadísticos:

- 5 La evaluación de la eficacia se analizó principalmente para la población por intención de tratar (ITT) que consistió en los 864 pacientes aleatorizados. Además, el análisis se repitió para la población por protocolo (PP), que consistió en 766 pacientes. Los pacientes que recibieron al menos ocho administraciones consecutivas de la medicación de estudio (semana 1 a 8) y no tuvieron una desviación importante del protocolo, tal como se define en los criterios de desviación, antes de deshacer el enmascaramiento se evaluaron como población por protocolo (PP).
- 10 El cálculo del tamaño de la muestra se llevó a cabo mediante el uso del programa Pass 2002. Se produjeron resúmenes estadísticos mediante el uso del programa informático SAS®, versión 8.1 o superior. Para el análisis de eficacia, se asignaron datos incompletos/parciales; los datos de seguridad que faltaron no se asignaron. Los eventos adversos y las historias médicas se codificaron mediante el uso del Diccionario Médico para Actividades Reglamentarias; las medicaciones se codificaron mediante el uso del Diccionario de Fármacos de la Organización Mundial de la Salud. El análisis de eficacia primaria se basó en la población por intención de tratar (ITT) y se repitió mediante el uso de la población por protocolo.
- 15

- Se describieron variables continuas mediante el uso de: el número de observaciones, la media aritmética, desviación estándar, mínimo, mediana y máximo. Las variables categóricas se presentaron mediante el uso del número de observaciones y porcentajes. Se aplicó el análisis jerárquico para SSE y ST para mantener el nivel de significación global en $\leq 5\%$ para ambos. Tanto SSE como ST se compararon entre la rama de girentuximab y la rama de placebo mediante el uso de la prueba de rango logarítmico y el método de Kaplan-Meier. Los niveles de significación para ST se ajustaron mediante el uso de la aproximación de O'Brien-Fleming para métodos secuenciales en grupos con un nivel de significación total del 5%. Se calcularon intervalos de confianza del 95% para las proporciones mediante el uso del método exacto (Pearson-Clopper).
- 20

- 25 El efecto potencial de los factores pronósticos sobre SSE y ST se investigó mediante el uso del modelo de los riesgos proporcionales de Cox. El cociente de riesgo (tratamiento con girentuximab frente a placebo) se estimó junto con su intervalo de confianza del 95% asociado y el valor de p mediante el uso de un modelo de los riesgos proporcionales.

Resumen de Resultados:

- 30 En el momento del límite para el análisis de datos, 360 pacientes (41,7%) habían experimentado un evento SSE y 504 (58,3%) todavía no presentaban enfermedad según la valoración del investigador local. Al 0,6% de los pacientes se les diagnosticó localmente una enfermedad metastásica al inicio. En total, habían muerto 181 pacientes. Después de la evaluación mediante lectura centralizada en el CRRRI, se pudo asignar un evento SSE a 389 pacientes (45%), mientras se pudo asignar una fecha de censura a los restantes 475 pacientes (55%). El número de eventos SSE
- 35 (293 excluyendo los pacientes con enfermedad metastásica en el inicio) que se dieron en la población ITT fue comparable entre las ramas de tratamiento (cG250: 142, 32,8%; Placebo: 151, 35,0%), al igual que la tasa de metástasis al inicio (SSE=0), observada en un 11,5% de los pacientes con girentuximab y un 10,7% de los pacientes con placebo.

- 40 El análisis primario de SSE basado en la evaluación del CRRRI para la población ITT no mostró una diferencia estadísticamente significativa en la SSE mediana total entre las ramas de tratamiento (cociente de riesgo [CR]=0,999, $p=0,737$). La SSE mediana para girentuximab fue de 71,4 meses, y no se alcanzó la SSE mediana para el grupo de placebo.

- 45 No hubo una diferencia estadísticamente significativa de SSE entre ramas de tratamiento, independientemente de la clasificación de Grupo de Riesgo (RG) elevado (RG I: CR=0,934, $p=0,596$; RG II: CR=1,73, $p=0,084$; RG III: CR=0,984, $p=0,627$).

- Además, los análisis exploratorios realizados mediante el uso de una clasificación basada en la expresión del antígeno de CAIX solamente según Bui et al. (Bui et al., Clinical Cancer Research 2003, 9: 802-811) no ha proporcionado resultados estadísticos significativos ni para el pronóstico ni para el efecto del tratamiento. Sin embargo, sorprendentemente la combinación de la expresión del antígeno de CAIX con la intensidad de la tinción, la puntuación de CAIX, que se puede considerar como una medida de la densidad de antígeno, mostró resultados
- 50 significativos para el efecto del tratamiento, así como para el pronóstico.

- El análisis multivariante para los umbrales de puntuación de CAIX (1,91 para ITT y 1,52 para ITT Placebo) obtenidos de los análisis del esquema de supervivencia muestran que la puntuación de CAIX es un factor pronóstico, pero no independiente, para el pronóstico en SSE ITT, ST ITT y ST Placebo. Los resultados sugieren que el umbral de puntuación de CAIX de 1,52 (ITT Placebo) puede ser útil para el pronóstico.
- 55

Para los pacientes con una puntuación de CAIX baja, las curvas de Kaplan-Meier para las diferentes ramas de

tratamiento solapan independientemente del umbral usado. Esto demuestra claramente que los pacientes con una puntuación de CAIX baja no se benefician del tratamiento.

5 Una puntuación de CAIX elevada de $\geq 1,91$ mostró una tendencia positiva para el efecto del tratamiento (CR=0,879, valor de p 0,248). Los análisis de los subgrupos para todas las puntuaciones de CAIX de 0,0 a 3,0 revelaron que a medida que se incrementa la puntuación de CAIX, más significativo se hace el efecto del tratamiento (Figura 1).

10 Una puntuación de CAIX $\geq 2,6$ da como resultado un efecto del tratamiento estadísticamente significativo con una SSE mediana que se incrementa desde 51,2 meses en la rama de placebo hasta 73,6 meses en los pacientes con cG250 (17% de toda la población de pacientes, CR=0,568; p=0,022; Figura 2). Los 151 pacientes de la población ITT con una puntuación de CAIX elevada de $\geq 2,6$ se distribuyeron uniformemente entre la rama de cG250 y la rama de placebo. De manera interesante, los pacientes de la rama de placebo mostraron un tiempo de SSE de 5 años (48,4 meses frente a 51,7 meses) similar a los pacientes con una puntuación de CAIX $< 2,6$ independientemente de la rama de tratamiento. El ajuste de la población para los pacientes con metástasis al inicio o para los pacientes con nódulos linfáticos positivos no cambió el resultado. Considerar la población PP con una puntuación de CAIX $\geq 2,6$ (N=139) mejoró tanto el cociente de riesgo como el nivel de significación (CR=0,508; p=0,007; Figura 2).

15 En conjunto, los resultados observados en la población ITT se reflejaron en los resultados en la población PP (Figura 3).

Un análisis de subgrupos adicional reveló un efecto del tratamiento estadísticamente significativo, con un incremento de la SSE mediana desde 55,2 meses en la rama de placebo hasta 70,9 meses en los pacientes con cG250 con una puntuación de CAIX de $\geq 2,0$ y < 65 años (CR=0,60; 95% IC 0,40-0,89; valor de p=0,01; Figura 4).

20 Además, los análisis han demostrado que los pacientes con RCC de células claras con estadio T alto (T3/T4), un grado bajo (G1/G2), sin implicación de nódulos linfáticos (N0/NX) y sin enfermedad metastásica tienen un pronóstico significativamente peor con una puntuación de CAIX baja en comparación con los pacientes con una puntuación de CAIX elevada.

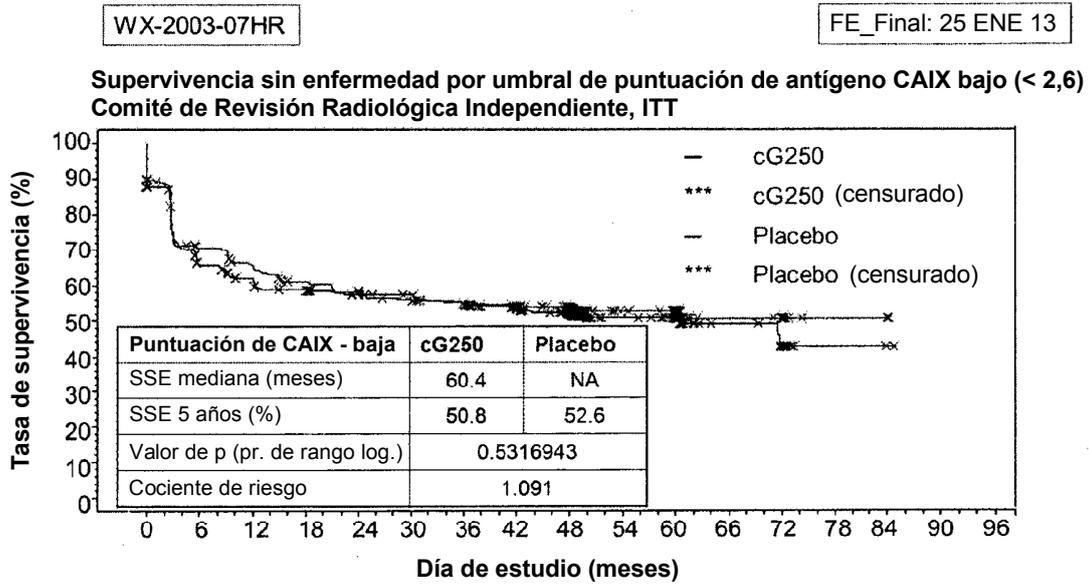
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-CAIX (anhidrasa carbónica IX) para el uso en el tratamiento del carcinoma de células claras renales (ccRCC), en el que el uso comprende cuantificar la expresión de CAIX en al menos una muestra tumoral proporcionada a partir de un sujeto a tratar, determinar una puntuación de CAIX basada en la expresión de CAIX en la muestra tumoral, y el sujeto se trata si se alcanza una puntuación de CAIX $\geq 2,6$,
en el que se cuantifica la expresión de CAIX mediante tinción inmunohistoquímica y
en el que la puntuación de CAIX se determina y/o se calcula mediante la fórmula:
Puntuación de CAIX = (0 x porcentaje de células tumorales viables sin intensidad de tinción) + (1 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción débil) + (2 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción moderada) + (3 x porcentaje de células tumorales viables con intensidad de tinción fuerte).
- 10 2. El anticuerpo anti-CAIX para el uso según la reivindicación 1, en el que la CAIX expresada comprende un polipéptido de CAIX o un fragmento de un polipéptido de CAIX.
3. El anticuerpo anti-CAIX para el uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la CAIX expresada comprende un mRNA que codifica un polipéptido de CAIX.
- 15 4. El anticuerpo anti-CAIX para el uso según las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo anti-CAIX es el anticuerpo girentuximab y/o un fragmento del mismo.
5. El anticuerpo anti-CAIX para el uso según las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo se une a la secuencia de aminoácidos LSTAFARV y/o ALGPGREYRAL.
- 20 6. El anticuerpo anti-CAIX para el uso según las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo se debe usar después de que el sujeto a tratar se haya sometido a la extirpación del tumor primario.
7. El anticuerpo anti-CAIX para el uso según las reivindicaciones 1-6 en una terapia adyuvante.

Figura 1

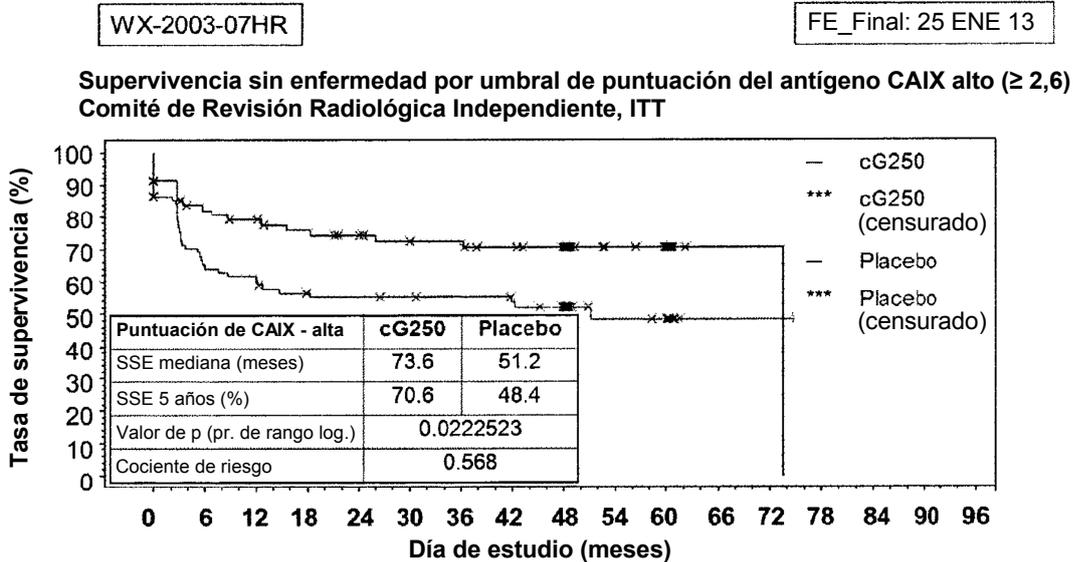
Umbral de CAIX			ITT		PP
>2.0	CR		0.78		0.70
	valor de p		0.137		0.049
	tam. de muestra		362		332
	eventos SSE		145		127
>2.1	CR		0.80		0.70
	valor de p		0.196		0.058
	tam. de muestra		322		296
	eventos SSE		130		114
>2.2	CR		0.73		0.65
	valor de p		0.094		0.031
	tam. de muestra		291		268
	eventos SSE		117		103
>2.3	CR		0.74		0.63
	valor de p		0.142		0.043
	tam. de muestra		234		213
	eventos SSE		94		82
>2.4	CR		0.77		0.67
	valor de p		0.253		0.098
	tam. de muestra		200		184
	eventos SSE		80		72
>2.5	CR		0.64		0.55
	valor de p		0.078		0.030
	tam. de muestra		166		153
	eventos SSE		65		59
>2.6	CR		0.54		0.48
	valor de p		0.040		0.019
	tam. de muestra		117		107
	eventos SSE		51		47

Figura 2



Número de pacientes en riesgo

Mes	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96
cG250	357	224	206	194	182	178	168	155	132	68	57	16	10	2	1	0	0
Placebo	341	227	209	191	182	172	162	155	133	63	52	14	11	3	3	0	0



Número de pacientes en riesgo

Mes	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96
cG250	69	53	50	46	43	40	39	36	32	17	14	1	1	0	0	0	0
Placebo	82	52	49	42	41	40	39	37	33	13	12	1	1	0	0	0	0

Figura 3

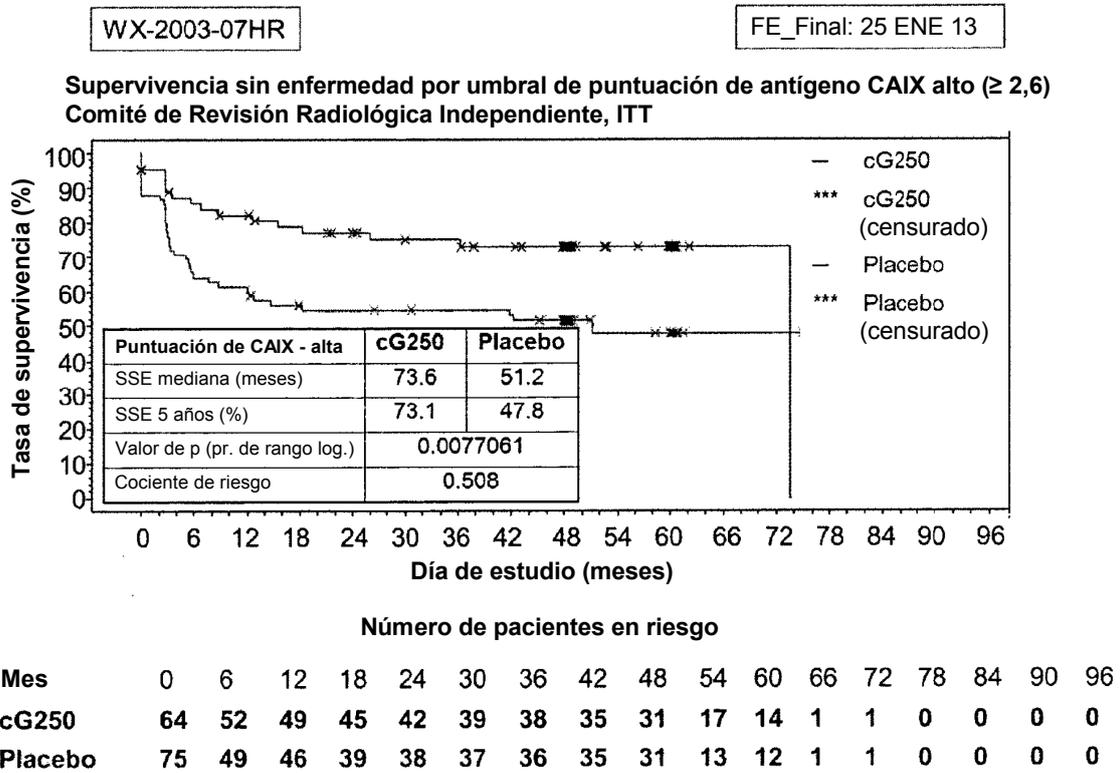


Figura 4

