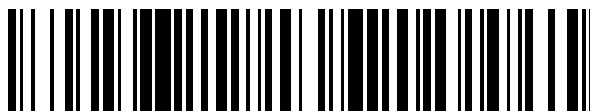


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 732**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/10** (2006.01)

**G01N 33/60** (2006.01)

**A61K 103/30** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2010 PCT/US2010/024475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10096486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2010 E 10705709 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2398504**

54 Título: **Métodos y kits para el diagnóstico de cáncer y la predicción de valor terapéutico**

30 Prioridad:

**17.02.2009 US 153132 P**

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

**14.05.2019**

73 Titular/es:

**CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.  
(100.0%)**

**395 Pine Tree Road, Suite 310  
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**BANDER, NEIL;  
OSBORNE, JOSEPH;  
GOLDSMITH, STANLEY y  
VALLABHAJOSULA, SHANKAR**

74 Agente/Representante:

**RIZZO , Sergio**

ES 2 712 732 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

Métodos y kits para el diagnóstico de cáncer y la predicción de valor terapéutico

## CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere, por lo general, a métodos para identificar y/o seleccionar a un paciente para el tratamiento de cáncer. Más específicamente, la invención se refiere al uso de imágenes cuantitativas o semicuantitativas para predecir el valor terapéutico de diversos tratamientos de cáncer.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El cáncer de próstata es una de las causas más comunes de muertes por cáncer en hombres estadounidenses. En 2007, se espera que se diagnostiquen aproximadamente 219 000 nuevos casos, así como que se registren 27 000 muertes a causa de esta enfermedad (datos del SEER del NCI; Cancer Facts and Figures, American Cancer Society). Actualmente, existen opciones de tratamiento muy limitadas para pacientes con cáncer de próstata una vez el cáncer ha producido metástasis (se ha extendido más allá de la próstata). La terapia sistémica se limita principalmente a diversas formas de privación de andrógenos (hormonas masculinas). A pesar de que la mayoría de pacientes mostrarán una mejoría clínica inicial, resulta prácticamente inevitable que se desarrollen células independientes de andrógenos. Por lo tanto, la terapia endocrina es paliativa, no curativa (Eisenberger M. A., *et al.* (1998) NEJM 339:1036-42). La media de supervivencia general de estos pacientes en los que se han desarrollado células independientes de andrógenos fue de 28-52 meses desde el comienzo del tratamiento hormonal (Eisenberger M. A., *et al.* (1998) *supra*). Tras el desarrollo de la independencia de andrógenos, únicamente la quimioterapia con taxanos (esto es, docetaxel) parece haber aportado un beneficio de supervivencia, con una supervivencia media de 19 meses. En el momento en que los pacientes no logran responder al docetaxel, la supervivencia media es de 12 meses.

[0003] Cuando el cáncer de próstata está localizado y la esperanza de vida del paciente es de 10 años o más, la prostatectomía radical brinda la mejor oportunidad para la erradicación de la enfermedad. Tradicionalmente, el inconveniente de este proceso consiste en que muchos cánceres se habían extendido más allá de los límites de la operación en el momento en que se detectaron los cánceres. No obstante, el uso de la prueba de antígeno prostático específico (PSA) ha permitido la detección precoz de cáncer de próstata. Como consecuencia, la cirugía es menos extensa y presenta menos complicaciones. Resulta menos probable que los pacientes con tumores voluminosos y de alto grado sean tratados con éxito mediante prostatectomía radical. La radioterapia ha sido ampliamente utilizada también como alternativa a la prostatectomía radical. Los pacientes que se tratan, por lo general, con radioterapia son los que son más mayores y están menos sanos, así como aquellos que presentan tumores de mayor grado y más avanzados desde el punto de vista clínico. Sin embargo, si, tras la cirugía o radioterapia, se encuentran concentraciones detectables de PSA en suero, se indica cáncer persistente. En muchos casos, las concentraciones de PSA se pueden reducir mediante tratamiento con radiación. No obstante, esta concentración de PSA aumenta de nuevo, a menudo, al cabo de dos años, siendo un síntoma de la recurrencia de la enfermedad.

[0004] Para el tratamiento de pacientes con enfermedad localmente avanzada, se ha empleado terapia hormonal antes o después de la prostatectomía radical o radioterapia. La orquiectomía (extirpación de los testículos) reduce las concentraciones de testosterona sérica, mientras que el tratamiento con estrógenos produce un efecto similar.

[0005] El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) está presente en la superficie celular de algunas células prostáticas epiteliales normales, células tubulares renales proximales normales, el intestino delgado proximal y algunos astrocitos (hallados en el cerebro). El PSMA está altamente regulado al alza/sobreexpresado en células de cáncer de próstata (Pca). Los niveles de expresión de PSMA aumentan al mismo tiempo que progresa el cáncer de próstata, y unos mayores niveles de PSMA en Pca de etapa temprana pronostican una mayor probabilidad de recurrencia. Por otro lado, prácticamente todos los tumores sólidos expresan PSMA en su neovasculatura tumoral, mientras que el endotelio vascular normal es PSMA-negativo.

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales que reconocen PSMA, incluyendo 7E11, que se une al dominio intracelular (Horoszewicz *et al.* (1987) *Anticancer Res.* 7:927-936; documentos de patentes americanas n.ºs 5,162,504; 6,107,090; US 6,150,508; y 7,045,605), y otros anticuerpos anti-PSMA que se unen al dominio extracelular. Se han desarrollado también anticuerpos modificados, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que reconocen PSMA, pese a ser menos inmunogénicos, como se describe en el documento WO 2004/098525. En el documento WO 2004/098525 se describe además un método de tratamiento de cáncer de próstata mediante la administración al sujeto de dos a veinticuatro dosis de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une al dominio extracelular de antígeno prostático específico de membrana (PSMA), y que se acopla a DM1, donde cada dosis comprende aproximadamente de 10 a 500 mg/m del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, para tratar de este modo al sujeto.

[0006] Los tratamientos contra el cáncer incluyen a menudo la administración de agentes terapéuticos que presentan efectos secundarios adversos o inconvenientes de otro tipo, incluida la toxicidad. Además, el efecto de

un tratamiento determinado en el cáncer de un paciente concreto es variable. En algunos pacientes, el tratamiento recibido puede resultar muy efectivo, mientras que, en otros, puede tener un efecto muy pequeño o no tener efecto alguno en el cáncer. Por otro lado, debido a los resultados impredecibles y variables del tratamiento, los ensayos clínicos han de ser muy amplios para que sean estadísticamente significativos. Los ensayos clínicos amplios pueden llegar a ser excesivamente caros o impracticables de otro modo. Por consiguiente, se necesitan tratamientos mejorados que reduzcan la toxicidad, mejoren la probabilidad de obtener un resultado favorable, y faciliten los ensayos clínicos.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

**[0007]** La invención incluye métodos y kits para el diagnóstico y el tratamiento de cáncer. En algunos aspectos, la invención está relacionada con métodos para identificar a un paciente o sujeto para terapia contra el cáncer. Los métodos comprenden proporcionar un primer agente aglutinante capaz de unirse a una primera diana molecular, donde la presencia de la primera diana molecular está relacionada con el cáncer o es indicativa de cáncer. Por lo tanto, se puede examinar la presencia del primer agente aglutinante en un tejido, célula(s) o fluido corporal. Preferiblemente, el primer agente aglutinante comprende una fracción de marcaje. En algunos aspectos, se evalúa la presencia del primer agente aglutinante mediante sistemas de imágenes *in vivo*, o bien se puede analizar la presencia del primer agente aglutinante en una muestra biológica obtenida del paciente. La presencia del primer agente aglutinante se puede analizar cualitativamente (p. ej., visualmente), semicuantitativamente o cuantitativamente. Cuando sea apropiado, los métodos incluirán además la administración al paciente de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante que pueda unirse a una diana molecular o celular.

**[0008]** En algunos aspectos de la invención, los métodos incluyen la administración a un paciente de una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable. El primer agente aglutinante marcado de manera detectable es capaz de unirse a una diana molecular asociada al cáncer (p. ej., una célula cancerosa o una célula relacionada, tal como la neovascularización de un tumor sólido). Cuando sea apropiado, los métodos incluyen además la administración al paciente de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante que puede unirse a una diana molecular o celular. El paciente o pacientes se selecciona(n) para la terapia en función de un resultado de administración de la dosis diagnóstica (p. ej., un diagnóstico *in vivo* no invasivo). Los resultados pueden incluir, por ejemplo, la cuantificación por imágenes o de otro modo de un nivel y/o localización del primer agente aglutinante en el paciente. Los pacientes que no se espera que se beneficien de una terapia concreta pueden identificarse, por lo tanto, antes de la terapia y ahorrarse la terapia y/o dirigirse a una terapia alternativa. En una forma de realización, el segundo agente aglutinante se puede unir a la misma molécula diana que el primer agente aglutinante. De manera alternativa, el segundo agente terapéutico aglutinante puede dirigirse a una molécula distinta. Asimismo, el primer y el segundo agente aglutinante pueden dirigirse a moléculas relacionadas desde el punto de vista funcional. Por ejemplo, la primera y segunda diana molecular pueden formar parte de una vía común.

**[0009]** En un ejemplo, los métodos descritos para identificar a un paciente para terapia contra el cáncer comprenden (i) proporcionar un primer agente aglutinante capaz de unirse a una primera diana molecular, donde la primera diana molecular se selecciona de una vía relacionada con el cáncer; (ii) evaluar la presencia del primer agente aglutinante en un tejido, células o fluido corporal en un paciente; y (iii) seleccionar a un paciente para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una segunda diana molecular, donde el paciente se selecciona si el primer agente aglutinante está presente.

**[0010]** Se describen también métodos para identificar a un paciente para la terapia contra el cáncer que comprenden (i) seleccionar una primera y una segunda diana molecular de una vía relacionada con el cáncer; (ii) proporcionar un primer agente aglutinante capaz de unirse a una primera diana molecular; (iii) calificar a un paciente evaluando la cantidad del primer agente aglutinante en un tejido, células o fluido corporal de un paciente; (iv) seleccionar a un paciente para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una segunda diana molecular, donde el paciente se selecciona si la calificación supera un umbral y donde la calificación superior a un umbral es indicativa de cáncer.

**[0011]** En un aspecto, se describe un método para la identificación de un paciente para terapia contra el cáncer que incluye la administración a un paciente de una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable. El primer agente aglutinante marcado de manera detectable puede unirse a una diana celular o molecular (p. ej., una porción extracelular de una diana de superficie celular, p. ej., PSMA). El método incluye además la selección de un paciente para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una diana celular, donde el paciente seleccionado presenta una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable.

**[0012]** En otro aspecto, se describe un método para tratar el cáncer de próstata que incluye la administración a un paciente de una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable. El primer agente aglutinante marcado de manera detectable es capaz de unirse a una diana celular o molecular (p. ej., una porción extracelular de una diana de superficie celular, p. ej., PSMA). El método incluye además la administración a un paciente seleccionado de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de

unirse a una diana celular, donde el paciente seleccionado presenta una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable.

**[0013]** Se describen también métodos para tratar el cáncer, que incluyen proporcionar instrucciones para administrar a un paciente una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable que sea capaz de unirse a una diana celular y/o proporcionar instrucciones para evaluar el nivel de expresión de marcador tumoral o molécula diana en una muestra biológica. En algunas formas de realización, se recogen células tumorales de muestra de sangre o de muestras de otro fluido corporal y se analizan para determinar la presencia y el nivel de expresión de la molécula diana. Los métodos incluyen además proporcionar instrucciones para administrar una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una diana celular a un paciente seleccionado en función del nivel de primer agente aglutinante en el paciente o en una muestra biológica obtenida del paciente.

**[0014]** En algunos aspectos, se describen métodos para mejorar la significación estadística de un ensayo clínico. En un aspecto, se describen métodos para reducir un número necesario de pacientes para un ensayo clínico. Los métodos pueden incluir la administración a una pluralidad de pacientes de una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable. El primer agente aglutinante marcado de manera detectable es capaz de unirse a una diana celular. El paciente o pacientes se selecciona(n) en función del nivel de primer agente aglutinante en el paciente o en una muestra biológica obtenida del paciente. No se seleccionan ciertos pacientes a los que se les ha administrado la dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable y, por consiguiente, no se les administra la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante. El método incluye además la administración a los pacientes seleccionados de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una diana celular. Mediante la selección de un paciente o pacientes con una mayor probabilidad de respuesta a la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante, y la no selección o exclusión de pacientes que presentan una probabilidad de respuesta favorable menor o nula al segundo agente aglutinante terapéutico, se mejora, de este modo, la capacidad del ensayo para lograr significación estadística en un número más reducido de pacientes tratados.

**[0015]** En otro aspecto, se describen kits para seleccionar a un paciente para la terapia contra el cáncer. Los kits pueden incluir instrucciones para la administración de una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable que es capaz de unirse a una diana celular y/o instrucciones para la evaluación del nivel de expresión de marcador tumoral o molécula diana en una muestra biológica. Los kits incluyen además instrucciones para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante a un paciente seleccionado.

**[0016]** Los kits pueden incluir también instrucciones para evaluar una muestra biológica con un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, siendo capaz el agente aglutinante marcado de manera detectable de unirse a una diana molecular, e instrucciones para seleccionar a un paciente para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una segunda diana molecular, donde el paciente seleccionado muestra una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable. El paciente o pacientes se selecciona(n) en función del nivel de primer agente aglutinante en el paciente o en una muestra biológica obtenida del paciente.

**[0017]** Asimismo, se describen métodos para seleccionar a un paciente para la terapia contra el cáncer, donde el paciente se selecciona sin administrar un agente terapéutico tóxico al paciente. En algunos aspectos, los métodos incluyen la administración a un paciente de un agente aglutinante marcado de manera detectable. El agente aglutinante marcado de manera detectable es capaz de unirse a una diana celular. Los métodos incluyen además la selección de un paciente para el tratamiento con un conjugado terapéutico que comprende el agente aglutinante y un agente terapéutico citotóxico o citostático. El paciente se selecciona en función del nivel de primer agente aglutinante en el paciente o en una muestra biológica obtenida del paciente.

**[0018]** En otro aspecto, se describen métodos para seleccionar a un grupo de pacientes de tratamiento, donde los pacientes se seleccionan sin la administración de un agente terapéutico tóxico a los pacientes. En algunos aspectos, los métodos incluyen la administración de un agente aglutinante a un primer grupo de pacientes, donde el agente aglutinante está marcado de manera detectable y es capaz de unirse a una diana celular, y donde el primer grupo de pacientes presenta o se sospecha que presenta una afección.

**[0019]** Los métodos incluyen también la selección de pacientes para el tratamiento de la afección con un conjugado terapéutico que comprende el agente aglutinante y un agente terapéutico citotóxico o citostático. Los pacientes se seleccionan en función del nivel de primer agente aglutinante en un paciente determinado o en una muestra biológica obtenida de un paciente determinado.

**[0020]** En otro aspecto más de la invención, se describen kits para la terapia contra el cáncer. Los kits incluyen una dosis diagnóstica para un paciente de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, siendo capaz el agente aglutinante marcado de manera detectable de unirse a una diana molecular. Los kits incluyen además instrucciones para seleccionar a un paciente para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una diana molecular, donde el paciente seleccionado muestra una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable. En otros aspectos, los kits

incluyen un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, siendo capaz el agente aglutinante marcado de manera detectable de unirse a una diana molecular, e instrucciones para seleccionar a un paciente para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una segunda diana molecular, donde el paciente seleccionado muestra una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable.

**[0021]** En otros aspectos, el método o kit descrito en el presente documento puede incluir una o más de las siguientes características.

**[0022]** La diana puede ser una diana intracelular o una diana de superficie celular. En diversas formas de realización, la afección o cáncer es cáncer de próstata y la diana de superficie celular es antígeno prostático específico de membrana (PSMA). De manera alternativa, el cáncer no es cáncer de próstata, y la diana de superficie celular es un marcador que se sabe que está presente en las células del tipo concreto de cáncer. En un ejemplo, el cáncer que no es cáncer de próstata puede incluir un tumor sólido asociado a la neovasculatura que expresa PSMA, y la diana de superficie celular puede ser el PSMA en las células neovasculares.

**[0023]** En un aspecto preferido, la selección de un paciente incluye la detección de la diana molecular o celular utilizando un primer agente aglutinante. La selección de un paciente puede incluir la cuantificación de una cantidad de la diana molecular o celular en el paciente, o bien puede incluir un ensayo cualitativo de la diana celular en el paciente. Según se ha descrito en el presente documento, el nivel de expresión de la diana celular o terapéutica se puede medir *in vitro* (p. ej., ensayo diagnóstico) o *in vivo* (p. ej., diagnóstico por imágenes *in vivo*) utilizando un primer agente aglutinante marcado de manera detectable que es capaz de unirse a la diana. Con frecuencia, se llevan a cabo pruebas diagnósticas en muestras biológicas extraídas de pacientes. Preferiblemente, estas muestras se obtienen de un modo mínimamente invasivo, por ejemplo, con muestras de suero o de orina. Las tecnologías de diagnóstico por imágenes *in vivo* ofrecen métodos no invasivos para determinar el estado de una enfermedad concreta en el cuerpo humano. Entre las técnicas convencionales de diagnóstico por imágenes se incluyen, aunque sin carácter limitativo, imágenes por resonancia magnética, exploración por tomografía computarizada, PET, SPECT y similares.

**[0024]** En algunas formas de realización, el nivel de expresión de la diana celular o terapéutica se mide *in vitro* en una muestra biológica. Normalmente, el nivel del marcador en una muestra biológica obtenida del paciente es distinto (esto es, ha aumentado o disminuido) del nivel del mismo marcador en una muestra similar obtenida de un individuo sano. La muestra puede derivar de cualquier fuente biológica, como tejidos, extractos, o cultivos celulares, incluyendo células (p. ej., células tumorales), lisados celulares y fluidos fisiológicos, tales como, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, saliva, fluido del cristalino, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, etc. La muestra se puede tratar antes de su uso, por ejemplo, preparando plasma a partir de sangre, diluyendo fluidos viscosos, etc. Por ejemplo, las células o el fluido corporal que contiene células obtenidas de un sujeto se pueden poner en contacto con un primer agente aglutinante *in vitro* marcado radiactivamente, o detectable y/o mensurable de otro modo. En otros aspectos, se administra a un paciente un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, y se observa el nivel de marcador detectable *in situ*. El método puede ser un método no invasivo *in vivo* o *ex vivo*.

**[0025]** Cualquiera de los métodos diagnósticos (p. ej., identificación o selección) puede incluir también la administración al paciente de una dosis terapéutica del segundo agente aglutinante. El primer y/o segundo agente aglutinante puede ser un anticuerpo o una porción de unión al antígeno o derivado de este. El anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este puede ser capaz de unirse al dominio extracelular de PSMA.

**[0026]** En algunas formas de realización, el marcador detectable incluye un isótopo seleccionado del grupo que consiste en <sup>177</sup>Lu, <sup>111</sup>Indio, <sup>67</sup>Cu, <sup>18</sup>F, <sup>99m</sup>Tc, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, y <sup>131</sup>I. El marcador detectable puede ser un agente de tomografía por emisión de positrones (PET) incluyendo, aunque sin carácter limitativo, <sup>124</sup>I, <sup>89</sup>Zr, etc. En ciertas formas de realización, el primer y/o segundo anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este está marcado radiactivamente. El marcador radiactivo puede ser al menos uno de <sup>177</sup>Lu, <sup>111</sup>Indio, <sup>67</sup>Cu, <sup>18</sup>F, <sup>99m</sup>Tc, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, y <sup>99m</sup>Tc. En otras formas de realización, el primer agente aglutinante puede estar marcado con un colorante o con cualquier otro agente detectable conocido por los expertos en la materia.

**[0027]** En diversas formas de realización, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este es un anticuerpo monoclonal o porción de unión al antígeno o derivado de este producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12101, un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12109, un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12127, y un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12126. El primer y/o segundo agente aglutinante presenta una afinidad de al menos aproximadamente 10<sup>-9</sup> M para la diana (p. ej., diana de superficie celular). El primer agente aglutinante y el segundo agente aglutinante pueden ser sustancialmente el mismo.

**[0028]** En algunos aspectos, el hecho de seleccionar a un paciente incluye cuantificar una cantidad de la diana (p. ej., diana de superficie celular) en los sitios del tumor del paciente. Para la cuantificación, se puede utilizar un método cuantitativo o semicuantitativo. La selección de un paciente puede incluir imágenes *in vivo* del primer agente aglutinante marcado de manera detectable. La selección de un paciente puede incluir un análisis

5 cualitativo de la diana (p. ej., diana de superficie celular) en el paciente. El método puede incluir la administración de un agente de contraste de imágenes junto con la dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable. Puede incluir también otras formas de modalidades de visualización de imágenes anatómicas (p. ej., TC y/o IRM) que se pueden combinar con las imágenes del primer agente aglutinante (p. ej., PET-TC, SPECT-TC, RM de imágenes planares, etc.).

[0029] En ciertos aspectos, la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante se administra al paciente seleccionado sin ninguna restricción en cuanto al intervalo de tiempo entre el primer agente aglutinante de diagnóstico y el segundo agente terapéutico. Preferiblemente, el intervalo debería ser inferior o igual a 3 meses, o inferior o igual a 1 mes o inferior o igual a 2 semanas.

10 [0030] En diversos aspectos, un kit puede incluir (p. ej., en una dosis diagnóstica y/o terapéutica) un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, un segundo agente aglutinante y/o un agente de contraste de imágenes. El primer agente aglutinante y el segundo agente aglutinante pueden ser sustancialmente el mismo.

15 [0031] Las diversas formas de realización descritas en el presente documento pueden ser complementarias, y se pueden combinar o utilizar juntas de un modo que conozcan los expertos en la materia a tenor de la descripción contenida en el presente documento. Otros aspectos de la invención se desprenderán de los dibujos y la descripción expuestos a continuación, los cuales ilustran principios de la invención únicamente a modo de ejemplo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 [0032] La patente y la solicitud presentada contienen al menos un dibujo realizado a color. La Oficina proporcionará copias de la publicación de la patente o de la solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y tras abonar la tasa necesaria.

La figura 1 muestra imágenes de cuerpo entero del mismo paciente tomadas tras la administración de <sup>99m</sup>Tc-MDP para una gammagrafía ósea y <sup>177</sup>Lu-J591 mAb (las dos imágenes de la izquierda y las dos imágenes de la derecha, respectivamente).

25 La figura 2 muestra un gráfico de concentración de PSA en sangre a lo largo del tiempo del paciente observado en la figura 1. El día 0 representa la fecha del tratamiento.

La figura 3 muestra un gráfico de cantidad de PSA a lo largo del tiempo en un paciente. El día 0 representa la fecha del tratamiento.

30 La figura 4 muestra un gráfico de cantidad de PSA a lo largo del tiempo en un paciente. El día 0 representa la fecha del tratamiento.

La figura 5 muestra imágenes de cuerpo entero de escáneres tomadas tras la administración de <sup>99m</sup>Tc-MDP (gammagrafía ósea) y <sup>177</sup>Lu-J591 mAb (las dos imágenes de la izquierda y las dos imágenes de la derecha, respectivamente).

35 La figura 6 muestra un gráfico de concentración de PSA a lo largo del tiempo del paciente observado en la figura 5. El día 0 representa la fecha del tratamiento.

La figura 7 muestra imágenes de cuerpo entero de escáneres tomadas tras la administración de <sup>99m</sup>Tc-MDP (gammagrafía ósea) y <sup>177</sup>Lu-J591 mAb (las dos imágenes de la izquierda y las dos imágenes de la derecha, respectivamente).

40 Las figuras 8A y 8B muestran gráficos semilogarítmico y aritmético de concentración de PSA a lo largo del tiempo del paciente observado en la figura 7. El día 0 representa la fecha del tratamiento.

La figura 9 muestra imágenes de cuerpo entero de escáneres tomadas tras la administración de <sup>99m</sup>Tc-MDP y <sup>177</sup>Lu-J591 mAb (las dos imágenes de la izquierda y las dos imágenes de la derecha, respectivamente).

Las figuras 10A y 10B muestran gráficos semilogarítmico y aritmético de concentración de PSA a lo largo del tiempo del paciente observado en la figura 9. El día 0 representa la fecha del tratamiento.

45 La figura 11 muestra un gráfico de respuesta a PSA tras el tratamiento frente a la calificación de imágenes J591 (0-3+).

La figura 12 muestra un gráfico que ilustra la relación entre la calificación de imágenes J591 (0-3+) y la respuesta a PSA.

50 Las figuras 13A y 13B muestran ejemplos de imágenes cuantificadas utilizando el método del índice de dirección tumoral (*tumor targeting index*, TTI, por sus siglas en inglés).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0033] En el presente documento, se dan a conocer métodos de identificación de un paciente o pacientes adecuado(s) para una terapia, tal como una terapia contra el cáncer. Los aspectos de la invención se dirigen a

métodos y kits para diagnosticar la presencia de cáncer en un paciente o sujeto, y para seleccionar al paciente o sujeto con cáncer para la terapia. Se pueden utilizar aspectos de la invención con una amplia variedad de tipos de cáncer. Entre los tipos de cáncer se incluyen, aunque sin carácter limitativo, el cáncer pancreático, melanomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, 5 cáncer de páncreas, cáncer estomacal, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer cerebral o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero o de endometrio, cáncer de la cavidad oral o faríngea, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer testicular, cáncer de las vías biliares, cáncer de intestino delgado o de apéndice, cáncer de glándulas salivales, cáncer de tiroides, cáncer de glándulas suprarrenales, osteosarcoma, condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos, 10 glioma, linfoma y similares.

**[0034]** Algunos aspectos se dirigen a un método para diagnosticar cáncer detectando la presencia y el nivel de expresión de una diana molecular, donde la diana molecular es de una vía concreta relacionada con el cáncer. En algunas formas de realización, los métodos comprenden el hecho de calificar la presencia, abundancia o nivel de expresión como superior a cierto umbral, siendo la calificación indicativa de cáncer. Se pueden utilizar los 15 métodos para diagnosticar cáncer y para predecir si un paciente o sujeto se beneficiará de la terapia contra el cáncer. Los métodos se pueden utilizar como estrategia de diagnóstico y de tratamiento para un paciente que se cree que presenta cáncer. Las dianas moleculares pueden provenir de cualquier vía asociada al cáncer, tal como, por ejemplo, una vía implicada en la regulación del cáncer. En algunos aspectos, los métodos comprenden la evaluación del nivel de expresión de un marcador tumoral o diana en un paciente utilizando imágenes *in vivo* y/o una prueba diagnóstica o muestra biológica. Un «marcador» es un ácido nucleico o proteína que puede estar alterado, donde dicha alteración está relacionada con el cáncer. La alteración puede poseer una 20 cantidad, estructura y/o actividad en un tejido canceroso o célula cancerosa, en comparación con su cantidad, estructura y/o actividad, en una célula o tejido normal o sano (p. ej., un control), y está asociada a un estado patológico, tal como cáncer. Entre las moléculas marcadoras producidas por cánceres se incluyen inmunoglobulinas monoclonales, hormonas, proteínas séricas secretadas, antígenos, enzimas e isoenzimas, marcadores de superficie celular, glucoproteínas y carbohidratos, proteínas de la matriz extracelular, mucinas y ácidos nucleicos (p. ej., ARNm, ADN, microARN). En algunos aspectos, se puede emplear la detección del estado de metilación de uno o varios gen(es) diana. Los marcadores de cáncer se pueden considerar 25 marcadores solubles, que aparecen en fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, efusiones y orina. Otros marcadores de cáncer son proteínas y ácidos nucleicos asociados a células que, de forma característica, no se liberan al suero ni a otros fluidos corporales en cantidades significativas. Los marcadores tumorales asociados a células o a tejidos se pueden detectar en muestras de tejidos que contengan células cancerosas, o en muestras biológicas que contengan tales células. Según se utiliza en el presente documento, el término «marcador tumoral» se utiliza como un indicador de la presencia, o la extensión, de un crecimiento canceroso o 30 tumor. Entre los ejemplos de marcadores tumorales se incluye, aunque sin carácter limitativo, PSA para el cáncer de próstata, CA 125 para el cáncer de ovario, CA 195 para cánceres gastrointestinales. Los marcadores tumorales pueden ser marcadores específicos de cáncer (p. ej., CA19-9, CA 125, CEA) o marcadores específicos de tejido (p. ej., PSA para el cáncer de próstata, CA15-3 para el cáncer de mama).

**[0035]** En algunos aspectos, el paciente o la muestra biológica obtenida del paciente se evalúa para determinar la presencia de la diana molecular específica. Según se utiliza en el presente documento, el término «evaluar» incluye cualquier forma de medición, e incluye determinar si una molécula se encuentra presente o no. Los términos «determinar», «medir», «analizar», «evaluar» y «examinar» se utilizan indistintamente, e incluyen 40 determinaciones cuantitativas, cualitativas y de imágenes que establecen la presencia o ausencia de una diana asociada al cáncer. La evaluación puede ser relativa o absoluta. En algunos aspectos, los métodos comprenden la calificación o cuantificación del nivel de una primera diana molecular. En algunas formas de realización, los métodos comprenden determinar si el nivel es superior o inferior en comparación con una muestra de referencia (p. ej., un sujeto sano o una muestra biológica obtenida de un sujeto sano), ya sea de manera cuantitativa, semicuantitativa o cualitativa. De manera alternativa, los métodos comprenden determinar un índice de dirección tumoral (TTI) cuantitativo.

**[0036]** En algunos aspectos, los métodos incluyen la administración a un paciente de una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable. El primer agente aglutinante marcado de manera 50 detectable es capaz de unirse, por ejemplo, a una diana celular o molecular. En algunos aspectos, la diana celular, también denominada en el presente documento diana terapéutica, es una porción extracelular de una diana de superficie celular. Se seleccionan uno o más pacientes para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una diana molecular o celular (p. ej., la porción extracelular 55 de la diana de superficie celular). El paciente o pacientes se selecciona(n) en función del nivel de primer agente aglutinante en el paciente o en una muestra biológica obtenida del paciente. La invención incluye, asimismo, kits para su uso en la identificación y/o el tratamiento de pacientes conforme a los métodos expuestos en el presente documento.

**[0037]** En diversos aspectos, los métodos pueden incluir: (i) identificar a un primer grupo de uno o más pacientes que estén desarrollando, presenten o se crea que presentan un cáncer; (ii) administrar a cada paciente del primer grupo una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, donde el 60

primer agente aglutinante marcado de manera detectable es capaz de unirse a una diana molecular o celular para el cáncer; (iii) observar el nivel del primer agente aglutinante marcado de manera detectable en cada paciente del primer grupo (p. ej., midiendo la diana de manera cuantitativa o cualitativa); (iv) seleccionar un segundo grupo de pacientes del primer grupo para una terapia contra el cáncer, en función del nivel observado en el paciente de primer agente aglutinante marcado de manera detectable; y (v) administrar una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante a uno o más pacientes del segundo grupo. En algunos de los métodos ofrecidos en el presente documento, se administra una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable a uno o más pacientes. A continuación, se administra una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante a pacientes seleccionados a los que se les había administrado el primer agente aglutinante marcado de manera detectable.

**[0038]** Asimismo, se describen métodos que incluyen (i) identificar un primer grupo de uno o más pacientes que estén desarrollando, presenten o se crea que presentan un cáncer; (ii) obtener una muestra biológica para cada paciente del primer grupo (iii) analizar la muestra biológica para determinar la presencia de un primer agente aglutinante en cada paciente del primer grupo, donde el primer agente aglutinante es capaz de unirse a una diana molecular o celular para el cáncer; (iv) evaluar el nivel del primer agente aglutinante en cada muestra biológica (p. ej., midiendo la diana de manera cuantitativa o semicuantitativa); (v) seleccionar un segundo grupo de pacientes del primer grupo para una terapia contra el cáncer, en función del nivel de primer agente aglutinante observado en el paciente; y (vi) administrar una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante a uno o más pacientes del segundo grupo. En algunos aspectos, el primer agente aglutinante comprende una fracción de marcaje (p. ej., marcada de manera detectable). La muestra biológica puede ser sangre u otro fluido corporal, tal como orina, líquido cefalorraquídeo, semen, etc.

**[0039]** En diversas formas de realización, incluyendo kits y métodos, el primer agente aglutinante y el segundo agente aglutinante o porciones de unión a la diana terapéutica de este son, o pueden ser, sustancialmente el mismo. De manera alternativa, el segundo agente aglutinante terapéutico se puede unir a una diana molecular o celular distinta del primer agente aglutinante, donde las dos dianas distintas están relacionadas desde el punto de vista funcional. En algunos aspectos, el primer agente aglutinante puede reconocer a un miembro o miembros de un distintivo genómico, proteómico, metabolómico o epigenómico asociado a una enfermedad específica. Los distintivos incluyen, por ejemplo, la presencia y/o niveles y/o modificación postraduccionales de una proteína o conjunto de proteínas; la presencia y/o el nivel de un ácido nucleico; y el estado de integridad o de metilación u otro parámetro de un ácido nucleico. En un ejemplo, el primer agente aglutinante puede identificar el nivel de un metabolito determinado o de otro gen o producto génico en una vía funcional, vía de señalización o vía reguladora.

**[0040]** El segundo agente terapéutico se puede destinar a la misma molécula o a una distinta en la vía. Por ejemplo, el primer agente aglutinante puede identificar el nivel del receptor androgénico (RA), mientras que el segundo agente terapéutico puede actuar en cualquier punto de la vía de señalización androgénica. En otro aspecto, el primer agente aglutinante puede reconocer a un miembro o miembros de un distintivo genómico, proteómico, metabolómico o epigenómico asociado a un método preferible de tratamiento o terapia dirigida. Por ejemplo, se puede utilizar el primer agente aglutinante, imágenes *in vivo* o una prueba diagnóstica para reflejar la presencia de un distintivo genómico, proteómico, metabolómico o epigenómico pertinente, y para dirigir de este modo la selección del enfoque terapéutico para el paciente. En algunos aspectos, la vía distintiva se puede dirigir a la combinación de terapias utilizando múltiples compuestos que se dirigen a múltiples vías. En algunos aspectos, el nivel del primer agente aglutinante puede demostrar ser predictivo de la respuesta al segundo agente aglutinante terapéutico.

**[0041]** En algunos aspectos, el primer agente aglutinante marcado de manera detectable y el segundo agente aglutinante son capaces de unirse a una diana terapéutica. La diana terapéutica puede estar asociada, directa o indirectamente, a una afección, tal como un cáncer. Entre las dianas terapéuticas adecuadas se incluye cualquier molécula o estructura extracelular o intracelular. En algunos aspectos de la descripción, la diana terapéutica es un antígeno. La diana terapéutica puede ser, por ejemplo, una porción extracelular de una molécula de superficie celular (p. ej., PSMA). En otros aspectos, las dianas terapéuticas son enzimas que participan en la transducción de señales (p. ej., tirosina quinasa).

**[0042]** El primer y/o segundo agente aglutinante puede(n) incluir un miembro de un par de unión, tal como receptor/ligando, anticuerpo/antígeno, enzima/sustrato, pequeña molécula/ligando, etc. El primer y/o segundo agente aglutinante puede(n) incluir un péptido o un aptámero diseñado y/o seleccionado para unir la diana diagnóstica y/o la diana terapéutica. Los aptámeros incluyen ácidos nucleicos (p. ej., ADN o ARN) o aptámeros peptídicos. En algunos aspectos, el primer y/o segundo agente aglutinante es un ligando para un receptor de superficie celular, o un sustrato para una molécula asociada a la célula, o un anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este que es capaz de unirse a la diana terapéutica. En un aspecto ilustrativo, el primer y/o segundo agente aglutinante son anticuerpos o derivados de estos. En otros aspectos, el primer y/o segundo agente aglutinante son pequeñas moléculas o derivados de estas. Las moléculas pequeñas presentan la ventaja de atravesar membranas y de alcanzar dianas dentro de las células. Por ejemplo, el primer y/o segundo agente aglutinante puede incluir un inhibidor de tirosina quinasa reversible (p. ej., gefitinib o Iressa®) o irreversible. Los inhibidores de tirosina quinasa se unen a los sitios de unión a ATP en el receptor de tirosina quinasa, impidiendo



la activación del receptor y la transducción de señales desde el receptor. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, Imatinib o Gleevec®, que se une al sitio de unión a ATP de bcr-abl, Gefitinib o Iressa®, que es un inhibidor selectivo del dominio tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), Erlotinib o Tarceva®, que se une de manera reversible al sitio de unión al trifosfato de adenosina (ATP) de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), bortezomib o Velcade®, que es un tripéptido que bloquea la unión al sitio catalítico del proteasoma 26S o de cualquier otra molécula pequeña (p. ej., sintetizada por un diseño racional). En algunos aspectos, el primer y/o segundo agente aglutinante puede ser una hormona, tal como testosterona (p. ej., dihidrotestosterona). Por ejemplo, un primer agente aglutinante marcado de manera detectable puede estar conjugado con dihidrotestosterona para un agente de imágenes, tal como un agente de imágenes PET.

**[0043]** En algunos aspectos, el primer y/o segundo agente aglutinante puede presentar una afinidad a al menos una porción de la diana terapéutica, siendo la afinidad más fuerte que aproximadamente  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  o  $10^{-10}$  M. El segundo agente aglutinante puede incluir un agente aglutinante desnudo o un agente aglutinante conjugado, derivado o marcado (p. ej., un agente aglutinante acoplado a un agente terapéutico y/o marcador).

**[0044]** La diana terapéutica puede estar localizada dentro de la célula, en lugar de en el exterior de la célula. En algunos aspectos, se selecciona el primer agente aglutinante de tal manera que es capaz de atravesar la membrana celular mediante difusión pasiva o transporte activo a través de la membrana celular. En algunos aspectos, el primer agente aglutinante es una molécula pequeña. En un aspecto preferido, se marca el primer agente aglutinante y, posteriormente, se visualiza al paciente. Una absorción escasa o nula indica la presencia reducida o la ausencia de la diana; una absorción moderada o elevada del primer agente aglutinante marcado indica una mayor presencia de la diana. La selección de pacientes con una mayor presencia de la diana en lugar de pacientes con una escasa o nula presencia de la diana pronosticaría una mayor probabilidad de respuesta a los segundos agentes aglutinantes terapéuticos.

**[0045]** El marcador detectable del primer agente aglutinante marcado puede ser prácticamente cualquier agente capaz de detectarse o medirse de manera cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. El marcador detectable puede ser cualquier agente adecuado para la visualización de imágenes *in vivo*. En algunos aspectos, el marcador detectable puede ser cualquier agente adecuado para la visualización de imágenes *in vitro* y/o *in vivo*. Las imágenes pueden incluir cualesquiera de: imágenes planares con radionúclidos, tomografía por emisión de positrones (PET), imágenes ecoplanares (EPI), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), ecografías (p. ej., sin radiación, específicas del contraste, de alta frecuencia, bidimensionales), imágenes por resonancia magnética (IRM, también denominada tomografía por resonancia magnética o TRM), rayos X, tomografías computarizadas (TC), imágenes fluorescentes, imágenes de infrarrojo cercano y otras técnicas de imágenes útiles o adaptables desde el punto de vista médico.

**[0046]** El marcador detectable puede ser un agente adecuado para el método de imágenes seleccionado. Por ejemplo, un radiomarcador puede ser al menos uno de  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  y  $^{89}\text{Zr}$ , cualquiera de los radiomarcadores descritos más adelante en relación con reactivos marcados, o cualquier otro radiomarcador útil o adaptable desde el punto de vista médico. En algunos aspectos, el marcador detectable tiene un efecto terapéutico cuando se administra una dosis suficiente. Sin embargo, no es necesario que el marcador detectable o el primer agente aglutinante tenga ningún efecto terapéutico independiente (p. ej., que destruya o extirpe células cancerosas). En otros aspectos, las marcas detectables adecuadas pueden incluir, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador de infrarrojo cercano, un marcador enzimático biológicamente activo, un marcador luminiscente o un cromóforo.

**[0047]** En algunos aspectos, el marcador detectable del primer agente aglutinante marcado y el agente terapéutico del segundo agente aglutinante conjugado son el mismo. En algunos aspectos, el marcador detectable del primer agente aglutinante marcado y el agente terapéutico del segundo agente aglutinante conjugado son  $^{177}\text{Lu}$ .  $^{177}\text{Lu}$  es un radionúclido que presenta una baja emisión de energía  $\beta$  (p. ej., aproximadamente 0,497 MeV) con un margen terapéutico relativamente estrecho y una emisión  $\gamma$  (p. ej., aproximadamente 0,113 y 0,208 MeV) que permite la formación de imágenes. En algunos casos, se puede utilizar  $^{177}\text{Lu}$  (incluso en dosis relativamente altas) sin toxicidad significativa en la médula ósea. En algunos casos,  $^{177}\text{Lu}$  resulta adecuado para tratar pequeños tumores (p. ej., de aproximadamente 2-3 mm).

**[0048]** En diversas formas de realización, la afección o cáncer es cáncer de próstata y la diana de superficie celular es antígeno prostático específico de membrana (PSMA). En otros aspectos de la descripción, el cáncer no es cáncer de próstata, y la diana de superficie celular es un marcador que se sabe que está presente en las células del tipo concreto de cáncer. En un ejemplo, el cáncer que no es cáncer de próstata puede incluir un tumor sólido asociado a la neovasculatura que expresa PSMA, y la diana de superficie celular puede ser el PSMA en las células de la neovasculatura.

**[0049]** En una forma de realización, tras administrar al paciente la dosis diagnóstica del primer agente aglutinante marcado de manera detectable, se observa el nivel de primer agente aglutinante marcado de manera detectable presente en el paciente utilizando un ensayo o método de detección adecuado para el marcador detectable. Se puede observar el nivel de marcador detectable, por ejemplo, sometiendo al paciente a un método adecuado de visualización de imágenes. En otra forma de realización, tras analizar una muestra biológica

obtenida del paciente utilizando un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, el nivel de primer agente aglutinante marcado de manera detectable presente en la muestra se evalúa utilizando un ensayo o método de detección adecuado.

[0050] Se puede observar el nivel de expresión o cantidad de la diana celular detectando el nivel de primer agente aglutinante marcado de manera detectable en el paciente o en una muestra biológica obtenida del paciente. Como se ha expuesto en el presente documento, se muestra que el nivel de primer agente aglutinante que se une o se dirige a la diana terapéutica *in vivo* predice y guarda relación con el efecto del tratamiento utilizando un segundo agente aglutinante. Esto permite seleccionar a un paciente o a una población de pacientes con una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento dirigido a la diana terapéutica. La correlación entre el nivel de primer agente aglutinante detectado (efecto de diagnóstico) y el efecto del tratamiento resultó inesperada debido a diversos motivos. En primer lugar, se había informado de que el 100 % de los cánceres de próstata eran PSMA-positivos [Bostwick, D.G., *et al.*, Cancer 82:2256-2261, 1998], que el 98-100 % de todos los Pca metastásicos se visualizaban con mAb para PSMA [Bander *et al.*, J. Clin. Oncol. 2005, 23:4591-4601; Bander, N.H., *et al.*, J. Urol. 2003, 170: 1717-1721], y que, como norma general, todos los Pca metastásicos expresaban niveles más altos de PSMA que las lesiones localizadas [Wright, G.L. *et al.*, Urol. Oncol. 1995, 1: 18-28; Wright, G.L., *et al.*, Urology 48:326-334, 1996; Sweat, S.D. *et al.*, Urol., 52:637-640, 1998]. Véase también Horoszewicz, JS, *et al.*, Anticancer Res. 1987. 7:927-936; Silver D.A. *et al.*, Clin Can Res 1997. 3: 81-85; Chang S.S. *et al.*, Urology, 2001. 57: 1179-83; Bostwick, DG, *et al.*, Cancer 1998. 82: 2256-2261; Ross, JS, *et al.*, Clin Can Res 2003. 9:6357-6362; Mannweiler, S, *et al.*, Pathol. Oncol. Res. 2009. 15:167-172; y Ananias, Hildo J.K. *et al.*, The Prostate 2009 10:1101-1108. Esto es muy coherente con los datos de imágenes en 137 pacientes en ensayos clínicos que recibieron mAb J591 específico para PSMA, ninguno de los cuales fue sometido a análisis para determinar la expresión de PSMA como un criterio de entrada (Bander N.H. *et al.*, J. Urol., 2003. 170:1717-1721; Milowsky M.I. *et al.*, J. Clin. Onc., 2004; 22:2522-2531; Bander N.H. *et al.*, J. Clin. Onc., 2005; 23:4591-4601; Scott T. *et al.*, ASCO Proceedings, 2008). En esos pacientes, el índice de éxito de la formación de imágenes era de ≈ 95 %. Prácticamente en cada paciente, todas las lesiones observadas en gammagrafía ósea convencional, TC y/o IRM se observaron en un escáner J591. Este cuerpo de datos *in vitro* e *in vivo* de varios grupos indicó que no había subconjuntos de pacientes identificables en función de la expresión de PSMA. Asimismo, debido a la extrema heterogeneidad biológica del cáncer de próstata (que oscila desde pacientes que presentan una enfermedad subclínica detectada únicamente en la autopsia hasta el otro extremo, en el que los pacientes mueren rápidamente como consecuencia de su enfermedad metastásica) y a la variabilidad intrínseca de los cánceres en general, y del cáncer de próstata en concreto, para responder a una terapia determinada, no se esperaba que un estudio diagnóstico para la expresión de PSMA (ya sea *in vitro* o *in vivo* mediante imágenes) permitiera una selección de pretratamiento de los pacientes con mayor (o menor) probabilidad de respuesta a las terapias dirigidas a PSMA. Además, se pensaba que la respuesta a un agente terapéutico dirigido (radiomarcado u otras citotoxinas) dependería de muchos factores, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, la capacidad del agente aglutinante para alcanzar la diana terapéutica, la capacidad del agente aglutinante terapéutico para penetrar en el tumor, la depuración del agente aglutinante desde las células tumorales, la depuración del agente aglutinante desde el organismo, así como la sensibilidad intrínseca relativa o la resistencia del cáncer al marcador radiactivo respectivo o a otras citotoxinas. Asimismo, no se esperaría predecir la sensibilidad relativa del tumor al marcador radiactivo o a otras citotoxinas mediante la detección del nivel de agente dirigido en el tumor o en el organismo. Además, anteriormente, los resultados de terapias contra el cáncer no han demostrado poder predecirse en función de la evaluación de estudios por imágenes de pretratamiento o del ensayo de unión en una muestra biológica.

[0051] En el caso de cánceres no prostáticos, se expuso que la neovasculatura que expresa PSMA estaba presente en el 95 % de los casos [Liu H. *et al.*, Cancer Res. 1997, 57(17):3629-34; Chang, S.S. *et al.*, Cancer Res., 59:3192-3198, 1999; Chang S.S. *et al.*, Clin. Cancer Res. 1999, 5(10):2674-81] y Morris, M. *et al.* [Clin. Can. Res. 2007; 13:2707-2713] descubrieron que un anticuerpo radiomarcado con PSMA era capaz de dirigirse *in vivo* al 95 % de pacientes no seleccionados con tumores sólidos metastásicos. Más recientemente, se ha descubierto que aproximadamente el 65 % de cánceres gástricos metastásicos y el 85 % de cánceres colorrectales metastásicos contienen neovasculatura que expresa PSMA [Haffner, M *et al.*, Hum. Pathol., 40:1754-1761, 2009] y se obtuvieron resultados similares en cánceres de mama, de ovario y de endometrio; es decir, un subconjunto variable de pacientes con tumores que no son Pca presentan neovasculatura PSMA-positiva. Como consecuencia, se puede seleccionar una subpoblación de pacientes que presenta tumores PSMA-positivos que no son Pca (tal como refleja un estudio de imágenes no invasivo o un análisis de la muestra biológica) para que sea tratada utilizando una terapia dirigida a PSMA, y es más probable que respondan favorablemente a que lo hagan los pacientes cuyos tumores sean PSMA-negativos.

[0052] La observación del nivel de una diana terapéutica *in vivo* utilizando un primer agente aglutinante marcado de manera detectable se puede emplear para seleccionar pacientes que se pronostique que puedan beneficiarse de la terapia y para excluir a pacientes que no se pronostique que puedan beneficiarse de la terapia. Los pacientes que no se pronostique que puedan beneficiarse de la terapia pueden beneficiarse, aun así, de la invención debido a que pueden quedar exentos de los potenciales efectos secundarios de la terapia que no es probable que sean beneficiosos, y previamente se pueden dirigir a tratamientos alternativos de los cuales puedan beneficiarse. Los pacientes que se prevea que se pueden beneficiar de la terapia pueden someterse a la terapia.

Además, los pacientes que se prevea que se puedan beneficiar de la terapia se pueden incluir en un ensayo clínico. En concreto, el hecho de visualizar imágenes o de leer el primer agente aglutinante marcado de manera detectable puede segregar pacientes identificando, por ejemplo, niveles variables de expresión del antígeno diana (p. ej., calificando el nivel o cantidad de la diana). Se puede definir un umbral predeterminado de la diana en función de una relación hipotética o empírica entre el nivel de diana y la capacidad de respuesta esperada a la terapia (p. ej., la expresión de PSMA por encima de un umbral indica que un paciente puede ser seleccionado para la terapia). Del mismo modo, los pacientes se pueden beneficiar de la invención debido a que, en diversas formas de realización, esta incluye métodos de diagnóstico *in vivo* que no precisan una biopsia de tejido (p. ej., al contrario que ensayos *in vitro*, tales como inmunohistoquímica, FISH, PCR, y similares, que se pueden emplear para seleccionar pacientes para tratamientos dirigidos, como trastuzumab y/o anti-EGFr). Otra ventaja se basa en que la invención ofrece información acerca de la totalidad de las lesiones de un paciente en lugar de solo de una única lesión que se someta a una biopsia invasiva y potencialmente peligrosa. La invención beneficia además a pacientes que no presentan una lesión accesible para la biopsia. Otra ventaja es la capacidad para seleccionar a un paciente para una quimioterapia anterior y/o un agente o régimen quimioterapéutico más agresivo. Otra ventaja más es la capacidad para proporcionar un tratamiento conocido de cáncer de próstata dirigido a PSMA a pacientes que presenten un cáncer que no sea de próstata asociado a la expresión de PSMA (p. ej., en la neovascularización de tumores sólidos).

**[0053]** En diversos aspectos descritos en el presente documento, la selección de pacientes adecuados para una terapia se puede distinguir de la selección de una dosis apropiada para una terapia (p. ej., la radioinmunoterapia utilizando agentes terapéuticos de anticuerpos, tales como Yodo-131 Tosutumomab, también conocido como BEXXAR®, se limita a determinar una dosis apropiada, y no determina si se debe tratar o no a un paciente ni predice cómo responderá un paciente a un tratamiento).

**[0054]** En diversos aspectos, cualquiera de los métodos diagnósticos (p. ej., identificación o selección) puede incluir también la administración al paciente de una dosis terapéutica del segundo agente aglutinante. El primer y/o segundo agente aglutinante puede ser un anticuerpo o una porción de unión al antígeno o derivado de este. El anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este puede ser capaz de unirse al dominio extracelular de PSMA.

**[0055]** Debería ser evidente que se pueden aplicar los mismos procedimientos cuando la diana esté presente en las células endoteliales neovasculares y/o en las células de tejido conectivo adyacentes a las células tumorales. Del mismo, se puede utilizar el primer agente aglutinante marcado para determinar la presencia y la cantidad relativa o absoluta de la molécula diana en un tumor de un paciente concreto, y emplearlo como criterio para seleccionar pacientes con niveles más elevados de la diana para que se sometan a tratamiento con el segundo agente aglutinante terapéutico, ya que sería más probable que este subconjunto de pacientes respondiera al segundo agente aglutinante terapéutico.

**[0056]** En algunas formas de realización, el marcador detectable incluye un isótopo seleccionado del grupo que consiste en <sup>177</sup>Lu, <sup>111</sup>Indio, <sup>67</sup>Cu, <sup>18</sup>F, <sup>99m</sup>Tc, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, y <sup>131</sup>I. El marcador detectable puede ser un agente de tomografía por emisión de positrones (PET), incluyendo, sin carácter limitativo, <sup>124</sup>I, <sup>89</sup>Zr, etc.

**[0057]** En ciertas formas de realización, el primer y/o segundo anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este está radiomarcado. El marcador radiactivo puede ser al menos uno de <sup>177</sup>Lu, <sup>111</sup>Indio, <sup>67</sup>Cu, <sup>18</sup>F, <sup>99m</sup>Tc, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, y <sup>99m</sup>Tc. De manera alternativa, el primer agente aglutinante puede estar marcado con un colorante o con cualquier otro agente detectable conocido por los expertos en la materia.

**[0058]** En diversas formas de realización, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este es un anticuerpo monoclonal o porción de unión al antígeno o derivado de este producido por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12101, un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12109, un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12127, y un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12126. El primer y/o segundo agente aglutinante presenta una afinidad de al menos aproximadamente 10<sup>-9</sup> M para la diana (p. ej., diana de superficie celular). El primer agente aglutinante y el segundo agente aglutinante pueden ser sustancialmente el mismo.

**[0059]** En algunos aspectos, el hecho de seleccionar a un paciente incluye la cuantificación de una cantidad de la diana (p. ej., diana de superficie celular) en los sitios del tumor del paciente. Para la cuantificación, se puede utilizar un método cuantitativo o semicuantitativo. La selección de un paciente puede incluir imágenes *in vivo* del primer agente aglutinante marcado de manera detectable. La selección de un paciente puede incluir un análisis cualitativo de la diana (p. ej., diana de superficie celular) en el paciente. El método puede incluir la administración de un agente de contraste de imágenes junto con la dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable. Además, puede incluir otras formas de modalidades de visualización de imágenes anatómicas (p. ej., TC y/o IRM) que se pueden combinar con la visualización de imágenes del primer agente aglutinante (p. ej., PET-TC, SPECT-TC, RM de imágenes planares, etc.).

**[0060]** En diversos aspectos, puede ser necesario un margen de tiempo entre la administración de la dosis diagnóstica del primer agente aglutinante marcado de manera detectable y la observación del nivel del primer

agente aglutinante marcado de manera detectable en el paciente. El tiempo comprendido entre la administración del primer agente aglutinante marcado de manera detectable y la observación del nivel del primer agente aglutinante marcado de manera detectable en el paciente puede ser determinado por un experto en la materia en función de la naturaleza del primer agente aglutinante y/o del marcador detectable. Por ejemplo, se puede determinar una cantidad adecuada de tiempo para observar el nivel mediante factores, incluyendo la localización del primer agente aglutinante marcado de manera detectable, la cantidad de ruido de fondo asociado a la señal del primer agente aglutinante marcado de manera detectable, la afinidad del primer agente aglutinante marcado de manera detectable por el agente terapéutico, el metabolismo del primer agente aglutinante marcado de manera detectable, y el tamaño del primer agente aglutinante marcado de manera detectable. La cantidad adecuada de tiempo puede ser de horas a semanas (p. ej., aproximadamente 1 o 2 horas, varios días o semanas).

**[0061]** En algunos aspectos, se describe que se observa el nivel de marcador detectable en el paciente y se asigna una calificación cualitativa al paciente en función de la cantidad relativa de marcador que se considere que está presente. Por ejemplo, cuando se utilice un método de visualización de imágenes para observar el marcador detectable en el paciente, la imagen obtenida se puede calificar como 0, 1+, 2+ o 3+, donde 3+ se les asigna a los niveles más altos detectados de marcador, y 0 se asigna a imágenes de pacientes que no mostraron una direccionalidad visible de la(s) lesión(es). En algunos aspectos, las imágenes se califican de manera visual (p. ej., por un profesional médico, tal como un radiólogo u oncólogo). En otros aspectos, las imágenes se califican de manera automática (p. ej., mediante programas informáticos). En un aspecto (por ejemplo,  $^{111}\text{In}$ -J591 o  $^{177}\text{Lu}$ -J591), las imágenes de pacientes las califica de manera visual un médico del modo siguiente: 0 = tumor no detectable, 1+ = ligera o débil captación tumoral detectable, 2+ = captación tumoral moderada (p. ej., menor que el hígado), 3+ = captación tumoral fuerte (p. ej., equivalente al hígado).

**[0062]** En función del nivel de marcador detectable en el paciente, se selecciona a un paciente para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de unirse a una diana extracelular o intracelular. En algunos aspectos, el segundo agente aglutinante es capaz de unirse a una porción extracelular de la diana de superficie celular. En concreto, cuando el paciente seleccionado muestra una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable, el paciente se selecciona para la administración de una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante. En diversos aspectos, la lectura positiva puede ser una respuesta predefinida (p. ej., una calificación superior a cierto umbral). La respuesta positiva puede ser empírica (p. ej., una calificación superior a la cual un paciente presenta una probabilidad razonable de respuesta al tratamiento). En ciertos aspectos, una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable puede incluir un ensayo cuantitativo (p. ej., una cantidad o nivel predeterminado de la diana). En algunos aspectos, una lectura positiva para el primer agente aglutinante marcado de manera detectable puede incluir un ensayo cualitativo (p. ej., presencia o ausencia de la diana). Un experto en la materia puede determinar el umbral, por ejemplo, comparando lecturas en una serie de pacientes obtenidas a partir del primer agente aglutinante y comparando esas lecturas con la respuesta derivada de la terapia con el segundo agente aglutinante terapéutico. De este modo, se puede definir y/o ajustar el umbral hasta el punto por debajo del cual la probabilidad de respuesta minimiza el valor de administración del segundo agente aglutinante terapéutico. Tras seleccionar a un paciente en función del nivel observado de marcador detectable, se puede administrar una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante.

**[0063]** En diversos aspectos, se permite que transcurra un período de tiempo entre la administración de la dosis terapéutica y la posterior selección del paciente. El tiempo transcurrido entre la selección del paciente y la administración de la dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante lo puede determinar un experto en la materia, por ejemplo, en función de la afección del paciente, la naturaleza del primer agente aglutinante y/o la naturaleza del segundo agente aglutinante, incluyendo cualquier agente terapéutico asociado al segundo agente aglutinante. En un aspecto, la dosis terapéutica se puede administrar inmediatamente después de observar el nivel del marcador detectable en el paciente. Esta elección puede incluir un tratamiento rápido del cáncer y una posibilidad de reducción de costes (p. ej., menos desplazamientos al hospital o clínica, y menos tiempo empleado por el médico y el paciente). En algunos aspectos, es posible administrar la dosis diagnóstica y la dosis terapéutica durante una única visita al hospital o clínica. En otro aspecto, puede existir una separación de días, semanas o meses entre la administración de la dosis terapéutica y el período de observación del nivel de marcador detectable. En ciertas situaciones, dicha separación puede resultar deseable (p. ej., durante la espera de un paciente hasta ser un mejor candidato para la terapia o, por ejemplo, durante la recuperación de la anemia o de otra afección física).

**[0064]** La dosis terapéutica del segundo agente aglutinante se puede administrar a un paciente (también denominado en el presente documento sujeto) en una única dosis o en múltiples dosis para tratar o para prevenir el avance de una enfermedad prostática o cancerosa. La o las dosis o se puede(n) elegir en función de distintos parámetros; en concreto, en función del modo de administración empleado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período de tratamiento deseado, y si se están administrando o utilizando al mismo tiempo otras formas de tratamiento junto con la dosis terapéutica.

**[0065]** En algunos aspectos, la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante se administra en una cantidad suficiente como para inhibir el crecimiento de las células cancerosas o para destruir las células cancerosas. Por

lo general, cuando el segundo agente aglutinante es un anticuerpo o una porción de este de unión al antígeno, una dosis terapéutica puede oscilar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 1000 mg. En algunos aspectos, se administra un anticuerpo al paciente en una cantidad suficiente como para alcanzar una concentración sérica de al menos aproximadamente 0,005-5 µg/ml de anticuerpo en el sujeto. En algunos aspectos, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno o derivado de este se administra en una cantidad suficiente como para alcanzar una concentración sérica de 10, 25, 50, 100 o 200 µg/ml. En algunos aspectos, un anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este es una porción de unión al antígeno de un anticuerpo, tal como un (Fab')<sub>2</sub>, y se administra al paciente en una cantidad suficiente como para alcanzar una concentración sérica de entre al menos aproximadamente 0,003 y al menos aproximadamente 3,3 µg/ml de la porción de unión al antígeno o derivado de este en el sujeto. En algunos aspectos, el (Fab')<sub>2</sub> se administra para alcanzar una concentración sérica de 6,6, 10, 20, 40 u 80 µg/ml. En algunos aspectos, el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de este se administra con una cantidad y frecuencia suficientes como para alcanzar una concentración sérica constante de la cantidad deseada.

**[0066]** El segundo agente aglutinante se puede administrar al sujeto de tal manera que el nivel sérico del segundo agente aglutinante sea constante durante el período de tiempo deseado. El nivel sérico deseado se puede basar en la cantidad del segundo agente aglutinante que se puede medir en una muestra de sangre, suero o plasma, o se puede basar, por ejemplo, en un resultado deseado, como la inhibición del crecimiento de las células cancerosas (p. ej., efecto citostático) o la destrucción de las células cancerosas (p. ej., efecto citotóxico). Un experto en la materia puede ajustar la dosis del segundo agente aglutinante, por ejemplo, en función del tamaño del agente aglutinante, y de la afinidad de unión del agente aglutinante y la diana. Se puede mantener un nivel adecuado de agente aglutinante en el suero mediante una dosificación repetida.

**[0067]** En algunos aspectos, el punto mínimo de suero y/o los niveles máximos de agente aglutinante se pueden determinar con anterioridad a la administración de la siguiente dosis de agente aglutinante. El punto mínimo y/o los niveles máximos de suero se pueden determinar utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica. El punto mínimo y/o los niveles máximos de suero se pueden utilizar para ajustar la dosis prescrita de agente aglutinante en pacientes concretos o grupos de pacientes.

**[0068]** Se pueden utilizar diversas vías para administrar el primer o segundo agente aglutinante. El modo concreto seleccionado dependerá del medicamento concreto elegido, de la gravedad del estado patológico que se esté tratando y de la dosis diagnóstica y terapéutica que se precise. Los métodos de la presente invención, por lo general, se pueden poner en práctica utilizando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, es decir, cualquier modo que produzca niveles efectivos de los compuestos activos sin provocar efectos secundarios inaceptables desde el punto de vista clínico. Entre tales modos de administración se incluye la vía oral, rectal, sublingual, tópica, nasal, transdérmica o parenteral. El término «parenteral» incluye la vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o infusión intravenosa.

La dosis terapéutica del segundo agente aglutinante se puede administrar una vez, de manera continuada, por ejemplo, mediante un bombeo continuo, o a intervalos periódicos. El intervalo periódico puede ser semanal, bisemanal, trisemanal o mensual. La dosificación puede tener lugar durante el período de un mes, dos meses, tres meses o más para obtener una respuesta terapéutica apropiada. Los intervalos de tiempo deseados para dosis múltiples de una composición concreta se pueden determinar sin experimentación indebida por parte de un experto en la materia.

**[0069]** En algunos aspectos, se describe que el primer y/o segundo agente aglutinante puede(n) estar conjugado(s) o conectado(s) (p. ej., por medio de un conector escindible o un conector no escindible) con otra entidad molecular, normalmente un marcador detectable o un agente terapéutico (p. ej., citotóxico o citostático). El primer y/o segundo agente aglutinante puede(n) estar conectado(s) de manera funcional (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas (p. ej., de diagnóstico o terapéuticas). El uso de un conector escindible permite la liberación del agente terapéutico en el citoplasma intracelular tras la asimilación del segundo agente aglutinante conjugado. Un conector no escindible permitiría la liberación tras la digestión del segundo agente aglutinante conjugado, o se puede utilizar con un agente que no necesite ser liberado del segundo agente aglutinante.

**[0070]** En algunos aspectos, el segundo agente aglutinante comprende un agente terapéutico tóxico. El agente terapéutico puede ser cualquier compuesto que resulte adecuado para tratar la afección, por ejemplo, inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas, o bien destruyendo las células cancerosas. Entre los agentes terapéuticos adecuados se incluye, por ejemplo, una fracción citotóxica, tal como un medicamento terapéutico, un radioisótopo, moléculas de origen vegetal, fúngico o bacteriano, o proteínas biológicas (p. ej., toxinas proteicas) o partículas biológicas (p. ej., nanopartículas o partículas víricas recombinantes, como una proteína vírica de la cubierta), o mezclas de estos. El agente terapéutico puede ser un medicamento u otro agente activo a nivel intracelular, tales como emisores de radiación de corto alcance, incluyendo, por ejemplo, emisores  $\alpha$  de alta energía y de corto alcance, según se describe en el presente documento. Entre los radioisótopos adecuados se incluye un emisor  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , o un emisor  $\beta$  y  $\gamma$ . Entre los radioisótopos que resultan útiles como agentes terapéuticos se incluye el itrio (<sup>90</sup>Y), lutecio (<sup>177</sup>Lu), actinio (<sup>225</sup>Ac), ástato (<sup>211</sup>At), renio (<sup>186</sup>Re), bismuto (<sup>212</sup>Bi o <sup>213</sup>Bi) y rodio (<sup>188</sup>Rh). Entre los radioisótopos útiles como marcadores (p. ej., para su uso en diagnósticos) se

incluye el yodo ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$  o  $^{125}\text{I}$ ), indio ( $^{111}\text{In}$ ), tecnecio ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), fósforo ( $^{32}\text{P}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ) y circonio ( $^{89}\text{Zr}$ ), o uno de los isótopos radiactivos listados anteriormente. En algunos aspectos, el segundo agente aglutinante puede estar acoplado a una molécula de origen vegetal, bacteriano o fúngico (o derivado de la misma), tal como un maitansinoide (p. ej., maitansinol o el maitansinoide DM1), un taxano, una calicheamicina o una duocarmicina. Si el segundo agente aglutinante es un anticuerpo o una porción de este de unión al antígeno, el segundo agente aglutinante puede estar conectado a otro anticuerpo o porción de este de unión al antígeno para formar, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico.

**[0071]** En algunos aspectos, el segundo agente aglutinante está acoplado (p. ej., mediante enlace covalente) a un inhibidor de proteosoma o a un inhibidor de topoisomerasa. El ácido [(1R)-3-metil-1-[[[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-[(3-mercaptopacetil) amino]propil]amino]butil] borónico es un inhibidor de proteosoma adecuado. N,N'-bis[2-(9-metilfenazina-1-carboxamido)etil]-1,2-etanodiamina es un inhibidor de topoisomerasa adecuado. En algunos aspectos, el segundo agente aglutinante se puede utilizar en combinación con otras terapias.

**[0072]** En algunos aspectos, otras terapias incluyen la administración de un agente citotóxico o quimioterapéutico al sujeto. Entre los ejemplos de agentes citotóxicos se incluyen agentes antimicrotubulares, inhibidores de topoisomerasa, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, agentes intercalantes, agentes capaces de interferir con una vía de transducción de señales, agentes que estimulan la apoptosis, agentes que interfieren en el metabolismo del folato y radiación. En algunos aspectos, el agente citotóxico puede ser taxol, taxotere, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, un maitansinoide, tal como maitansinol (véase el documento de patente estadounidense n.º 5,208,020), CC-1065 (véanse los documentos de patente estadounidense n.ºs 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545) y/o análogos u homólogos de los mismos.

**[0073]** En caso de que los métodos y composiciones dados a conocer en el presente documento se utilicen para tratar pacientes que presenten trastornos prostáticos, como cáncer de próstata, el segundo agente aglutinante puede ser un anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este que sea capaz de unirse a un dominio extracelular de PSMA, y se puede utilizar en combinación con modalidades terapéuticas ya existentes, tales como prostatectomía (focal, parcial o radical), radioterapia, terapia de ablación prostática (p. ej., terapia hormonal, criocirugía, ablación láser, ultrasonido focalizado de alta intensidad, y similares) y quimioterapia citotóxica, según se han descrito anteriormente. Normalmente, la terapia hormonal actúa para reducir los niveles de andrógenos en un paciente, y puede implicar la administración de un análogo o agonista (p. ej., Lupron®, Zoladex®, leuprolide, busarelina o goserelina) de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés), así como antagonistas (p. ej., Abarelix). En la terapia hormonal, se pueden utilizar también antiandrógenos no esteroideos, incluyendo flutamida, bicalutamida o nilutamida, así como antiandrógenos esteroideos (p. ej., acetato de ciproterona o acetato de megestrol), estrógenos (p. ej., dietilestilbestrol), castración quirúrgica, manipulaciones hormonales secundarias o terciarias (por ejemplo, que impliquen el uso de corticosteroides (p. ej., hidrocortisona, prednisona o dexametasona), ketoconazol, abiraterona, MDV3100 y/o aminoglutetimida), inhibidores de 5 $\alpha$ -reductasa (p. ej., finasteride, dutasterida), preparados vegetales, hipofisectomía y adrenalectomía. Además, la terapia hormonal se puede llevar a cabo de manera continua, intermitente o empleando combinaciones de cualquiera de los tratamientos expuestos anteriormente (p. ej., uso combinado de leuprolida y bicalutamida).

**[0074]** Los métodos de tratamiento del cáncer dados a conocer en el presente documento se pueden emplear para tratar cualquier cáncer, tal como cáncer de próstata o tumores sólidos que comprendan al menos algunas células que expresen PSMA en sus superficies celulares. En humanos, el PSMA se expresa en la superficie de células epiteliales prostáticas hiperplásicas normales y benignas (p. ej., epitelio acinar de secreción prostática benigna), células epiteliales prostáticas cancerosas (p. ej., neoplasia intraepitelial prostática y adenocarcinoma de próstata), y células endoteliales vasculares próximas a ciertas células cancerosas. Entre estos tipos de cáncer que contienen vasculatura PSMA-positiva se incluyen (aunque sin carácter limitativo), por ejemplo, células cancerosas renales, uroteliales (p. ej., de vejiga), testiculares, de colon, rectales, pulmonares (p. ej., carcinoma pulmonar de células no pequeñas), de mama, hepáticas, neurales (p. ej., neuroendocrinas), gliales (p. ej., de glioblastoma), pancreáticas (p. ej., de ducto pancreático), ováricas, endometriales, de melanoma (p. ej., melanoma maligno), o de sarcoma de tejidos blandos. Entre los ejemplos de trastornos prostáticos que se pueden tratar o prevenir se incluye, aunque sin carácter limitativo, la inflamación genitourinaria (p. ej., prostatitis), agrandamiento benigno, por ejemplo, hiperplasia nodular (hipertrofia o hiperplasia benigna de próstata); y cáncer (p. ej., adenocarcinoma o carcinoma) de los tumores de próstata y/o de testículos, incluyendo el cáncer de próstata recurrente. La «recurrencia» o un cáncer de próstata «recurrente» se refiere a un incremento de los niveles de PSA tras un tratamiento anticanceroso (p. ej., prostatectomía y/o radiación) de más de 0,4 ng/dl (o niveles de PSA inferiores a 0,4 ng/dl, si se utilizan ensayos más sensibles) en dos pruebas consecutivas separadas por un período de un mes. La recurrencia del cáncer puede tener lugar en un período breve de tiempo desde el tratamiento anticanceroso (p. ej., inmediatamente, unas cuantas semanas o meses después del tratamiento, o puede tener lugar varios años después de un tratamiento anticanceroso). Por ejemplo, en pacientes con cáncer de próstata, la recurrencia se puede dar varios años después de un tratamiento

anticanceroso (p. ej., hasta aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15 o más años después del tratamiento). La recurrencia se puede clasificar como «recurrencia local», «recurrencia regional» o «recurrencia distante». La «recurrencia local» se refiere a cánceres que reaparecen en tejido u órganos adyacentes o próximos al tejido u órgano canceroso primario. Por ejemplo, en sujetos que presenten cáncer de próstata, la recurrencia local se puede producir en tejido cercano a la próstata, la fosa prostática, en las vesículas seminales, los músculos cercanos a la próstata, y/o la pared rectal. La recurrencia regional podría implicar a los ganglios linfáticos circundantes en la pelvis y/o en las paredes de la pelvis. La «recurrencia distante» se refiere a cánceres que reaparecen lejos del tejido u órgano canceroso. Por ejemplo, en sujetos que presentan cáncer de próstata, la recurrencia distante incluye cánceres que se propagan a los huesos o a otros órganos a cierta distancia del sitio primario. El término «cáncer» incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos que hayan experimentado una transformación maligna, sin tener en cuenta el tipo histopatológico o la etapa de invasividad. En algunos aspectos, las células cancerosas o las células próximas a las células cancerosas (tales como las células vasculares endoteliales) expresan el PSMA en su superficie celular.

**[0075]** Los métodos para tratar el cáncer expuestos en el presente documento se pueden utilizar para tratar cáncer no prostático. Entre los ejemplos de trastornos cancerosos no prostáticos se incluyen, aunque sin carácter limitativo, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos y lesiones metastásicas. Entre los ejemplos de tumores sólidos se incluyen tumores malignos, tales como sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas, de los diversos sistemas de órganos, tales como los que afectan al pulmón, pecho, tracto linfático, tracto gastrointestinal (p. ej., colon) y tracto genitourinario (p. ej., células renales, uroteliales), faringe, etc. Los adenocarcinomas incluyen tumores malignos, tales como cánceres de colon, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. Las lesiones metastásicas de los cánceres mencionados anteriormente se pueden tratar o prevenir también utilizando los métodos y composiciones dados a conocer en el presente documento.

**[0076]** El término «anticuerpo» incluye una proteína que comprende al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de cadena pesada (H) de la inmunoglobulina (abreviadas en el presente documento como VH), y al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de cadena ligera (L) de la inmunoglobulina (abreviadas en el presente documento como VL) que son capaces de unirse de manera específica a un antígeno determinado. Según se utiliza en el presente documento, un «derivado» significa que se modifica uno o más átomos o porciones de la molécula con respecto a la estructura de referencia. Según se utiliza en el presente documento, el hecho de «unirse de manera específica» hace referencia a la propiedad del anticuerpo para unirse a un antígeno (p. ej., PSMA) con una afinidad de al menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>. En algunos aspectos, la unión específica se refiere a la capacidad para unirse a un antígeno específico (p. ej., proteína PSMA humana) con una afinidad que es de al menos el doble, 10 veces más, 50 veces más, 100 veces más, 1000 veces más, o más que su afinidad para unirse a un antígeno independiente que no sea el antígeno específico o que sea ajeno al antígeno específico. Por consiguiente, en algunos aspectos, la unión específica a PSMA se refiere a la capacidad para unirse a un PSMA específico (p. ej., proteína PSMA humana) con una afinidad que es de al menos el doble, 10 veces más, 50 veces más, 100 veces más, 1000 veces más, o más que su afinidad para unirse a un antígeno independiente que no sea PSMA o que sea ajeno a PSMA (p. ej., BSA, caseína, etc.).

**[0077]** Las regiones VH y VL se pueden subdividir, además, en regiones hipervariables, denominadas «regiones determinantes de complementariedad» («CDR»), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas «regiones marco» (FR). La extensión de la región marco y las CDR se han definido de manera precisa (véase, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, publicación de NIH n.º 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En algunos aspectos, cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de aminoterminal a carboxiterminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

**[0078]** La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir, además, la totalidad o parte de las regiones constantes de cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina. En un aspecto, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de la inmunoglobulina. En algunos aspectos, las cadenas pesada y ligera están interconectadas mediante enlaces disulfuro. En algunos aspectos, la región constante de cadena pesada consta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. En algunos aspectos, la región constante de cadena ligera consta de un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno, tal como la porción extracelular de PSMA o una porción de este. En algunos aspectos, las regiones constantes de los anticuerpos median en la unión del anticuerpo con tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmune (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. De esta manera, el anticuerpo puede provocar una respuesta citotóxica celular dependiente del anticuerpo y/o una citotoxicidad mediada por complemento. El término «anticuerpo» incluye inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas), donde las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda.

**[0079]** El término «porción de unión al antígeno o derivado de este» incluye cualquier porción de una molécula de anticuerpo que se une específicamente al antígeno (tal como PSMA o una porción extracelular de PSMA). Por

ejemplo, una porción de unión al antígeno de un anticuerpo incluye moléculas en las que una o más cadenas de la inmunoglobulina no es de longitud completa, pero es capaz de unirse de manera específica al antígeno. Entre los ejemplos de porciones de unión abarcadas en el término «porción de unión al antígeno o derivado de este» se incluye, por ejemplo, (i) un fragmento Fab, tal como un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprenda dos fragmentos Fab conectados mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consista en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consista en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546) que consista en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada que presente un marco suficiente capaz de unirse de manera específica al antígeno o a una porción de unión al antígeno de una región variable. Una porción de unión al antígeno de una región variable de cadena ligera y una porción de unión al antígeno de una región variable de cadena pesada, tales como los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se pueden unir empleando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permita formarse como una única cadena proteica, en la que las regiones VL y VH se emparejen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Se pretende que tales anticuerpos de cadena simple queden abarcados también en el término «porción de unión al antígeno de este». También dentro del término «porción de unión al antígeno o derivado de este», se incluyen variantes estructurales realizadas a partir de anticuerpos, o derivadas de anticuerpos, tales como diacuerpos, minicuerpos, anticuerpos de cadena simple, etc. Según se utiliza en el presente documento, el término «minicuerpo» se refiere a un anticuerpo recombinante en el cual las regiones variables de cadena pesada y ligera forman parte de la misma cadena polipeptídica, que incluye también la región bisagra de cadena pesada y un dominio constante de cadena pesada. La cadena simple puede estar dimerizada, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Según se utiliza en el presente documento, el término «diacuerpo» se refiere a un anticuerpo recombinante que comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera, unidas mediante un conector peptídico flexible, siendo el conector lo suficientemente largo como para permitir la separación de los dominios, de modo que dos de los polipéptidos se puedan ensamblar en un dímero, provocando que el anticuerpo sea divalente. Estos fragmentos de anticuerpos y/o variantes estructurales de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos y variantes estructurales se analizan y se seleccionan por su capacidad de unión al antígeno respectivo (p. ej., PSMA).

**[0080]** Muchos tipos de anticuerpos, o porciones de unión al antígeno o derivados de este, resultan útiles en los métodos y composiciones dados a conocer en el presente documento. Los anticuerpos pueden ser de los diversos isótopos, incluyendo: IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE. Preferiblemente, el anticuerpo es un isótopo IgG (p. ej., IgG1). Las moléculas de anticuerpo pueden ser de longitud completa (p. ej., un anticuerpo IgG1 o IgG4), o pueden incluir únicamente una porción de unión al antígeno (p. ej., un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv o Fv de cadena simple). Entre estos, se incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos desinmunizados, y anticuerpos humanos, así como porciones de unión al antígeno de los anteriores. Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales o porciones de unión al antígeno o derivados de estos se unen al dominio extracelular de PSMA o a una porción de este (p. ej., un epítipo de PSMA situado en el exterior de una membrana celular). Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales preferidos que son capaces de unirse a PSMA se incluye J415, que es producido por la línea celular de hibridoma que posee un número de acceso ATCC HB-12101, y J591, que es producido por la línea celular de hibridoma que posee un número de acceso ATCC HB-12126.

**[0081]** El anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este puede humanizarse mediante métodos conocidos en la técnica. Una vez obtenidos los anticuerpos murinos, se pueden secuenciar las regiones variables. Puede determinarse la ubicación de las CDR y los residuos del marco (véase Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, publicación de NIH n.º 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). Las regiones variables de cadena ligera y pesada pueden estar ligadas, de manera opcional, a las regiones constantes correspondientes.

**[0082]** El anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este puede modificarse, además, para delecionar epítipos de linfocitos T humanos específicos (a los que también se hace referencia en el presente documento como "desinmunizados"). Se exponen métodos adecuados para desinmunizar anticuerpos, por ejemplo, en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. En resumen, pueden analizarse las regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este (por ejemplo, un anticuerpo murino o porción de unión al antígeno o derivado de este) para determinar la presencia de péptidos que se unan a CMH de clase II; estos péptidos representan epítipos de linfocitos T potenciales (tal como se define en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de epítipos de linfocitos T potenciales, se puede aplicar un enfoque de modelado computarizado, y además se puede buscar una base de datos de péptidos de unión a CMH de clase II humanos para hallar motivos presentes en las secuencias murinas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 alotipos DR principales de CMH de clase II y, por lo tanto, constituyen epítipos de linfocitos T potenciales. Cualquier epítipo de linfocito T potencial detectado puede eliminarse sustituyendo residuos de aminoácidos en las regiones variables o mediante sustituciones de



aminoácidos simples. En la medida en que se realizan posibles sustituciones conservadoras, con frecuencia, aunque no exclusivamente, se puede utilizar un aminoácido común en esta posición en secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Se exponen secuencias de la línea germinal humana en Tomlinson, I. A. *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; Cook, G. P. *et al.* (1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. *et al.* (1992) *J. Mol. Bio.* 227:799-817. El directorio V BASE ofrece un amplio directorio de secuencias de regiones variables de inmunoglobulina humana (recopilado por Tomlinson, I. A. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Tras formarse las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> desinmunizadas, la secuencia variable mutagenizada puede fusionarse, de manera opcional, con una región constante humana.

**[0083]** En otros aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este puede presentar al menos una, dos, y, preferiblemente, tres CDR de la región variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo J591 producidas por la línea celular que posee un número de acceso ATCC HB-12126 o el anticuerpo J591 desinmunizado (deJ591) producido por la línea celular que posee un número de acceso ATCC PTA-3709.

**[0084]** En otros aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este puede presentar al menos una, dos, y, preferiblemente, tres CDR de la región variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo J415 producidas por la línea celular que posee un número de acceso ATCC HB-12109 o el J415 desinmunizado producido por una línea celular que posee un número de acceso ATCC PTA-4174.

En otros aspectos adicionales, el anticuerpo o porción de unión al antígeno de este puede presentar al menos una, dos y, preferiblemente, tres CDR de la región variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo J533 producidas por la línea celular que posee un número de acceso ATCC HB-12127 o el anticuerpo E99 producido por una línea celular que posee un número de acceso ATCC HB-12101.

**[0085]** En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este se une a la totalidad o a parte del epítipo de un anticuerpo descrito en el presente documento incluyendo J591 (producido por el hibridoma HB-12126 depositado en el ATCC), E99 (producido por el hibridoma HB-12101 depositado en el ATCC), J415 (producido por el hibridoma HB-12107 depositado en el ATCC) y J533 (producido por el hibridoma HB-12127 depositado en el ATCC). El anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este puede inhibir (por ejemplo, inhibir de manera competitiva) la unión de un anticuerpo descrito en el presente documento, como J591, E99, J415 y J533, al PSMA humano. En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este se une al epítipo reconocido por J415. En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este se une al epítipo reconocido por J591. En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este se une al epítipo de E99. En algunos aspectos, el anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este se une al epítipo reconocido por J533.

**[0086]** Se puede determinar si dos anticuerpos o porciones de unión al antígeno o derivados de este son capaces de unirse específicamente a los mismos o a epítopos solapados utilizando el análisis Scatchard y/o ensayos de unión competitiva. La "unión específica" de un anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este implica que el anticuerpo muestra una suficiente afinidad a un antígeno o a un epítipo preferido y, preferiblemente, no exhibe una reactividad cruzada significativa. La "unión específica" incluye unión a anticuerpos, por ejemplo, con una afinidad de al menos 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, o 10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>. Un anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este que no muestre una reactividad cruzada significativa es uno que no se unirá de manera evidente a una entidad no deseada (por ejemplo, una entidad proteínica no deseada) en condiciones adecuadas para medir la especificidad del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este que se una de manera específica al PSMA se unirá de manera evidente al PSMA, pero no reaccionará significativamente con péptidos o proteínas que no sean de PSMA. Un anticuerpo de una porción de unión al antígeno o derivado del mismo específico para un epítipo preferido, por ejemplo, no producirá, de manera significativa, reacción cruzada ni inhibirá de manera competitiva la unión a epítopos remotos en la misma proteína o péptido. Los anticuerpos o porciones de unión al antígeno o derivados de los mismos que reconocen al mismo epítipo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestre la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana (por ejemplo, un ensayo de unión competitiva). La unión competitiva se determina en un ensayo en el que el anticuerpo sometido a ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, como el PSMA. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) indirecto o directo de fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés) indirecto o directo de fase sólida, ensayos competitivos de tipo sándwich (véase Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983), véase también Kim, *et al.*, *Infect. Immun.* 57:944 (1989)); EIA directo con avidina-biotina de fase sólida (véase Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayos marcados directos de fase sólida, ensayos marcados directos de tipo sándwich de fase sólida (véase, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988) pp. 567-569 y 583); RIA marcado directo de fase sólida utilizando un marcador 1-125 (véase Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA directo con avidina-biotina de fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); RIA marcado directo (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)); y (Belanger L. *et al.* *Clin. Chim. Acta.*, 48:15-18 (1973)). Normalmente, dicho ensayo implica el uso de un antígeno purificado unido a una superficie sólida o células portadoras del antígeno, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide al determinar la cantidad de marcador

unido al antígeno en presencia del anticuerpo de ensayo en relación con la cantidad de marcador unido al antígeno en ausencia del anticuerpo de ensayo.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

5 **[0087]** Se seleccionaron treinta y dos pacientes para este estudio. Se les administró a los pacientes  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP para una gammagrafía ósea convencional, y  $^{177}\text{Lu}$ -J591 en distintos días. El estudio se dividió en dos cohortes. La cohorte 1 (n = 15) recibió una dosis de  $^{177}\text{Lu}$ -J591 de 65 mCi/m<sup>2</sup>. La cohorte 2 (n = 17) recibió una dosis de  $^{177}\text{Lu}$ -J591 de 70 mCi/m<sup>2</sup> (p. ej., aproximadamente, la dosis máxima tolerada). Aproximadamente 3 horas después de la administración de  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP por vía intravenosa para una gammagrafía ósea convencional, se sometió a los pacientes a un diagnóstico por imágenes planares con radionúclidos en una gammacámara planar. Los procedimientos de diagnóstico óseo por imágenes planares con radionúclidos resultan conocidos en la medicina nuclear y para los expertos en la materia.

15 **[0088]** Se obtuvieron imágenes de cuerpo completo de  $^{177}\text{Lu}$ -J591 y  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP para cada paciente. Además, los pacientes se sometieron a una tomografía axial computarizada y/o a una RM para visualizar los tejidos blandos que no se observan en la gammagrafía ósea. Las imágenes y/o escáneres con  $^{177}\text{Lu}$ -J591 de cada paciente se calificaron/anotaron a ciegas para que el marcador radiactivo se dirija a los sitios de tumor 5-8 días tras el tratamiento. El sistema de calificación de imágenes midió la intensidad de unión o absorción del agente  $^{177}\text{Lu}$ -J591 dirigido. Las imágenes se calificaron a ciegas como: 0+ para ninguna focalización; 1+ para un diagnóstico por imágenes débil de las lesiones; 2+ para un diagnóstico por imágenes moderado de las lesiones; 20 y 3+ para un diagnóstico por imágenes fuerte/excelente de las lesiones. Los niveles de PSA también se obtuvieron de cada paciente antes de la administración de  $^{177}\text{Lu}$ -J591 y  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP, y durante el transcurso del estudio. Tras la calificación a ciegas, cada calificación de los pacientes se comparó con la respectiva respuesta al PSA de los pacientes tras el tratamiento (por ejemplo, el cambio en el nivel de PSA en función de tiempo). El progreso de la enfermedad se definió como un aumento en el PSA de al menos un 25 % del PSA desde el nadir (al menos 5 ng/ml) o una progresión radiográfica (1 nueva lesión en gammagrafía ósea o >20 % mediante RECIST (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos) en un diámetro de una lesión de tejido blando o en la aparición de una(s) nueva(s) lesión(es).

25 **[0089]** Tal como se muestra en las figuras 1-10, los pacientes representaron un amplio espectro de respuesta a la terapia (por ejemplo, la respuesta antitumoral a  $^{177}\text{Lu}$ -J591) que varía entre una respuesta nula (por ejemplo, una progresión continua de la enfermedad) y aproximadamente un descenso del 90 % en el PSA.

30 **[0090]** La figura 1 representa a un paciente con un escáner J591 de grado 1+ (es decir, un diagnóstico por imágenes débil). Tal como se muestra en la gammagrafía ósea con  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP y en el escáner con mAb  $^{177}\text{Lu}$ -J591, este paciente presenta una gran lesión en el lado derecho de la pelvis y varias lesiones adicionales en la gammagrafía ósea posterior (columna, costillas, pelvis) que únicamente se captan levemente en el escáner J591. El tratamiento (por ejemplo, la dosis terapéutica de segundo agente aglutinante) se administró en el día 0. La respuesta del paciente al tratamiento, medida como el cambio en el PSA (ng/ml), se muestra en la figura 2. Tal como se muestra en las figuras 1 y 2, el paciente prácticamente no respondió al tratamiento (es decir, la trayectoria en el PSA no se vio afectada).

35 **[0091]** Las figuras 3 y 4 ilustran los resultados del PSA de dos pacientes adicionales con escáneres J591 de grado 1+ que no respondieron al tratamiento, medidos mediante el cambio o la progresión en el PSA.

40 **[0092]** La figura 5 muestra a un paciente con un escáner J591 de grado 2+ (es decir, un diagnóstico por imágenes moderado). Tal como se muestra en la gammagrafía ósea con  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP y en el escáner con mAb  $^{177}\text{Lu}$ -J591, este paciente presenta una gran lesión en el lado derecho de la cadera en la gammagrafía ósea (indicado con un gran \*) y una lesión más pequeña en el lado izquierdo de la cadera (\* pequeño), mostrando ambos una intensidad de imagen moderada. El tratamiento (por ejemplo, la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante) se administró en el día 0. La respuesta del paciente al tratamiento, medida como el cambio en el PSA, se muestra en la figura 6. Tal como se muestra en las figuras 5 y 6, el paciente mostró una buena respuesta al tratamiento (es decir, la concentración de PSA dejó de aumentar en el día 0, coincidiendo con la administración de la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante).

45 **[0093]** La figura 7 ilustra otro paciente con un escáner J591 de grado 2+. Tal como se muestra en la gammagrafía ósea con  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP y en el escáner con  $^{177}\text{Lu}$ -J591 mAb, se visualizaron dos lesiones distintas en la pelvis. El tratamiento (por ejemplo, la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante) se administró en el día 0. La respuesta del paciente al tratamiento, medida como el cambio en el PSA, también se muestra en gráficos semilogarítmico (figura 8A) y aritmético (figura 8B). El paciente mostró una buena respuesta al tratamiento (es decir, el PSA disminuyó aproximadamente un 58 %).

50 **[0094]** La figura 9 representa a un paciente con un escáner J591 de grado 3+ (es decir, un diagnóstico por imágenes fuerte/excelente). Tal como se muestra en la gammagrafía ósea con  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP y en el escáner con  $^{177}\text{Lu}$ -J591 mAb, aparecen múltiples lesiones intensas distintas bien marcadas con J591. El tratamiento (por ejemplo, la dosis terapéutica del segundo agente aglutinante) se administró en el día 0. La respuesta del

paciente al tratamiento, medida como el cambio en el PSA, se muestra tanto en gráficos semilogarítmico (figura **10A**) como aritmético (figura **10A**). El paciente mostró una respuesta excelente al tratamiento (es decir, el PSA disminuyó aproximadamente un 90 %).

5 **[0095]** La figura **11** ilustra una relación entre la calificación de imágenes J591 y la respuesta tras el tratamiento (reflejada por el cambio en PSA), que permite predecir una respuesta al tratamiento en función de la calificación del escáner J591. La figura **12** también ilustra una relación entre la calificación de imágenes J591 y la respuesta al PSA tras el tratamiento, que permite predecir una respuesta al tratamiento en función de la calificación del escáner J591 (la respuesta al PSA tras el tratamiento mostrado en el eje y y la calificación mostrada en el eje x).  
 10 En concreto, los pacientes con un escáner J591 de grado 1+ presentaron una progresión de la enfermedad (por ejemplo, un incremento del PSA, figura 12, 1201) a pesar del tratamiento, y los pacientes con un escáner de grado 2+ o 3+ muestran respuestas significativas al tratamiento (por ejemplo, una disminución del PSA, figura 12, 1202).

EJEMPLO 2

15 **[0096]** Un ejemplo de una alternativa a la escala de calificación semicuantitativa de 0-3+ es calcular un índice de dirección tumoral (TTI) cuantitativo. Esto puede llevarse a cabo en un escáner J591 de un paciente midiendo la densidad del conteo en la(s) lesión(es) tumoral(es) más prominente(s) dividida por el área de píxeles de esas respectivas lesiones. A continuación, se corrige la densidad del conteo de la lesión para la densidad del conteo de fondo realizando los mismos cálculos (densidad de conteo dividida por área de píxeles en la región de interés (ROI, por sus siglas en inglés) utilizando una zona negativa de lesión generalmente en la cara anterior del muslo derecho). La densidad del cuerpo completo se define como la media geométrica de los conteos de imágenes anteriores y posteriores por píxel.  $TTI = (\text{densidad de conteo de la ROI de la lesión} - \text{densidad de conteo de fondo}) / (\text{densidad de conteo corporal total})$ . Los conteos de tumores se calculan para un tumor determinado, sobre el área del tumor:

$$T_{\text{cts/área}} = \frac{\text{counts\_per\_region}_{\text{tumor}}}{\text{region\_area(px)}_{\text{tumor}}} \quad T_{\text{cts/área}} = \frac{\text{conteos\_por\_región}_{\text{tumor}}}{\text{área\_de\_región(px)}_{\text{tumor}}}$$

25 Los conteos de fondo (BG) se calculan para una región determinada, sobre el área de la región:

$$BG_{\text{cts/área}} = \frac{\text{counts\_per\_region}_{\text{background}}}{\text{region\_area(px)}_{\text{background}}} \quad BG_{\text{cts/área}} = \frac{\text{conteos\_por\_región}_{\text{fondo}}}{\text{área\_de\_región(px)}_{\text{fondo}}}$$

Los conteos corporales se calculan para el anterior y el posterior

$$Body_{\text{cts/área}} = \sqrt{\frac{\text{Counts\_Ant}_{\text{tot\_body}} * \text{Counts\_Pos}_{\text{tot\_t}}}{\text{Cuerpo}_{\text{cts/área}}}} = \sqrt{\frac{\text{Conteos\_Ant}_{\text{tot\_cuerpo}} * \text{Conteos\_Pos}_{\text{tot\_cuerpo}}}{\text{área\_de\_región(px)}_{\text{tot\_cuerpo}}}}$$

$$TTI = T_{\text{cts/área}} - BG_{\text{cts/área}} / Body_{\text{cts/área}} \quad TTI = T_{\text{cts/área}} - BG_{\text{cts/área}} / \text{Cuerpo}_{\text{cts/área}}$$

30 **[0097]** Los valores semicuantitativos del índice de dirección tumoral (TTI) se midieron en un total de 64 lesiones y se determinó la respuesta del paciente a la terapia (reducción o estabilización del PSA). La figura **13A** muestra un ejemplo de buena focalización del tumor (el mismo paciente de la figura 9 y la figura 10), que corresponde a un escáner de grado 3 (calificado tal como se ha indicado anteriormente) y un valor de TTI de 9,8 (calculado tal como se ha indicado anteriormente). La figura **13B** muestra un ejemplo de mala focalización del tumor, correspondiente a un escáner de grado 1+ y un valor de TTI de 2,4.  
 35

**[0098]** La reducción o estabilización del PSA tuvo lugar en el 64 % de los pacientes estudiados. Los sujetos que respondieron presentaban un nadir medio de PSA de  $67 \pm 24$  % del punto de referencia. La mayor reducción de PSA fue del 87 %. De los 13 pacientes cuyos escáneres se calificaron con  $\leq 2$ , 7 (54 %) presentaron una reducción en el PSA, 3 (23 %) mostraron estabilización, tal como se muestra en la Tabla 1. De los 9 pacientes cuyos escáneres se calificaron con  $< 2$ , 2 (22 %) presentaron una reducción en el PSA, 2 (22 %) mostraron estabilización, tal como se muestra en la Tabla 1. La relación entre valores de TTI de las 64 lesiones y la respuesta al tratamiento (cambios en los valores de PSA) se muestra en la Tabla 2.  
 40

**Tabla 1:** Focalización con <sup>177</sup>Lu-J591, medida mediante escáneres calificados, frente a respuesta clínica.

Calificación	Estabilización	Reducción	Total
$\leq 2$	3 (23 %)	7 (54 %)	13
$< 2$	2 (22 %)	2 (22 %)	9

**Tabla 2:** Focalización con <sup>177</sup>Lu-J591, medida mediante TTI, frente a respuesta clínica.

TTI	Estabilización	Reducción 10-30 %	Reducción >30 %	Total
≤4	5 (25 %)	10 (50 %)	5 (25 %)	20
<3	9 (47 %)	9 (47 %)	1 (5 %)	19

EJEMPLO 3: Uso de tomografía por emisión de positrones (PET) para el diagnóstico por imágenes

[0099] De manera similar al uso del diagnóstico por imágenes planares descrito anteriormente, o imágenes SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único), también se podría utilizar la tomografía por emisión de positrones (PET) para el diagnóstico por imágenes. El diagnóstico por imágenes PET proporciona datos cuantitativos y directos que reflejan la captación del primer agente aglutinante. El diagnóstico por imágenes PET se puede llevar a cabo con un agente emisor de positrones, como <sup>124</sup>Yodo, <sup>89</sup>zirconio, <sup>86</sup>itrio, u otros agentes emisores de positrones conocidos por los expertos en la materia, unidos al primer agente aglutinante. Al igual que se ha descrito anteriormente, los "valores estándar de captación" (SUV) cuantitativos derivados de PET permiten la identificación de pacientes cuyas lesiones muestran una captación más elevada, frente a aquellas con una captación menor o nula. Se podría predecir que los pacientes con lesiones que muestren SUV más altos muestran una captación más elevada del segundo agente aglutinante terapéutico, seguido, a su vez, por un aumento de la probabilidad de aportar un beneficio terapéutico. El uso de una modalidad de diagnóstico por imágenes directamente cuantitativo, como PET, obvia la necesidad de calificar visualmente la captación (por ejemplo, 0-3+) o de calcular el TTI tal como se ha descrito anteriormente. Al comparar los SUV de pacientes que no responden ni se benefician del segundo agente terapéutico dirigido con los SUV de pacientes que sí responden o se benefician del segundo agente terapéutico dirigido, un experto en la materia puede determinar un umbral por debajo del cual el tratamiento con el segundo agente terapéutico tiene poco valor en comparación con los pacientes con SUV por encima del umbral.

20

## REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para identificar a un paciente que presenta cáncer metastásico que sea adecuado para la terapia dirigida contra el cáncer comprendiendo:
- 5 proporcionar un primer agente aglutinante capaz de unirse al antígeno prostático específico de membrana (PSMA);
- calificar a un paciente analizando la cantidad del primer agente aglutinante en un tejido, células o fluido corporal en un paciente; e
- 10 identificar a un paciente adecuado para la terapia dirigida contra el cáncer, donde dicha terapia comprende una dosis terapéutica de un segundo agente aglutinante capaz de ligar el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), donde el paciente se identifica únicamente si la calificación es superior a un umbral predeterminado, donde la calificación superior al umbral indica cáncer susceptible para la terapia dirigida contra el cáncer y donde el umbral predeterminado es superior a la cantidad del primer agente aglutinante en una muestra de control sana.
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el primer agente aglutinante comprende un marcador detectable.
3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el cáncer es cáncer de próstata.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos un agente aglutinante es capaz de ligarse a un dominio extracelular de PSMA, preferiblemente donde el primer agente aglutinante
- 20 marcado de manera detectable es capaz de ligarse a un dominio extracelular de PSMA en la neovasculatura de un tumor sólido.
5. Método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el primer o segundo agente aglutinante comprende un marcador radiactivo, preferiblemente donde el marcador radiactivo es al menos uno de entre  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .
- 25 6. Método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el primer o segundo agente aglutinante comprende un anticuerpo o porción de unión al antígeno o derivado de este, un ligando, aptámero, molécula pequeña o péptido capaz de unirse a PSMA.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno o derivado de este comprende un anticuerpo monoclonal o porción de unión al antígeno o derivado de este producido por un
- 30 hibridoma seleccionado del grupo que consiste en un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12101, un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12109, un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12127, y un hibridoma depositado con el número de acceso al depósito ATCC HB-12126.
8. Método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el primer o segundo agente aglutinante presenta una afinidad a PSMA de al menos aproximadamente  $10^{-9}$  M.
- 35 9. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa de calificación de un paciente por medio del análisis de la cantidad del primer agente aglutinante comprende cuantificar una cantidad de PSMA.
10. Método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el umbral predeterminado es superior a la cantidad del primer agente aglutinante en una muestra procedente de un paciente con cáncer no metastásico.
- 40 11. Método según cualquier reivindicación anterior, donde el umbral predeterminado es superior a la cantidad del primer agente aglutinante en una muestra procedente de un paciente con cáncer metastásico no adecuado para dicha terapia dirigida contra el cáncer.
12. Kit para su uso en la identificación de un paciente que presenta cáncer metastásico que es adecuado para la terapia dirigida contra el cáncer comprendiendo:
- 45 una dosis diagnóstica de un primer agente aglutinante marcado de manera detectable, siendo capaz el agente aglutinante marcado de manera detectable de unirse al PSMA; e
- instrucciones para identificar a un paciente que presenta cáncer metastásico que resulte adecuado para la terapia dirigida de cáncer, donde dicha terapia comprende una dosis terapéutica de un segundo agente
- 50 aglutinante capaz de unirse al PSMA, donde dichas instrucciones para identificar a un paciente comprenden la identificación de un paciente únicamente si la calificación es superior a un umbral predeterminado, donde la calificación superior al umbral indica cáncer metastásico que resulta adecuado para la terapia dirigida contra el cáncer y donde el umbral predeterminado es superior a la cantidad del primer agente aglutinante en una muestra de control sana.
13. Kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, comprendiendo además una dosis terapéutica del segundo agente aglutinante.

**$^{99m}\text{Tc}$ -MDP**  
(gammagrafía ósea)

**$^{177}\text{Lu}$ -J591 mAb**

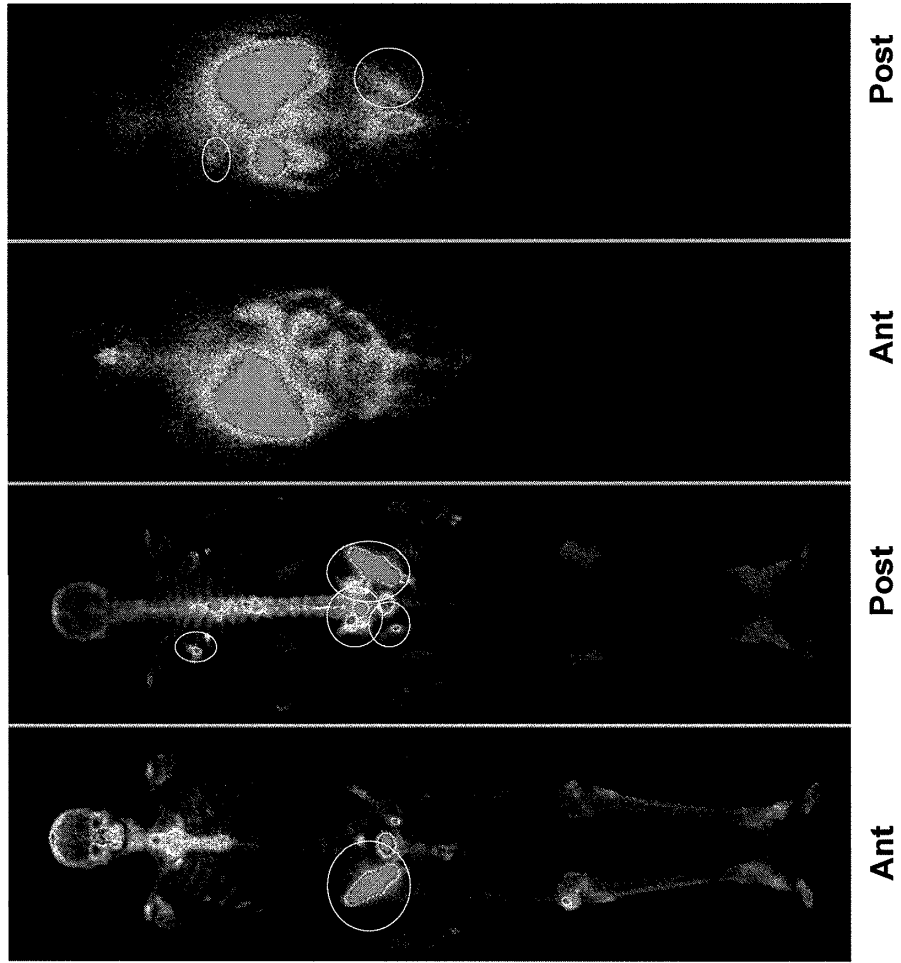


FIG. 1

FIG. 2

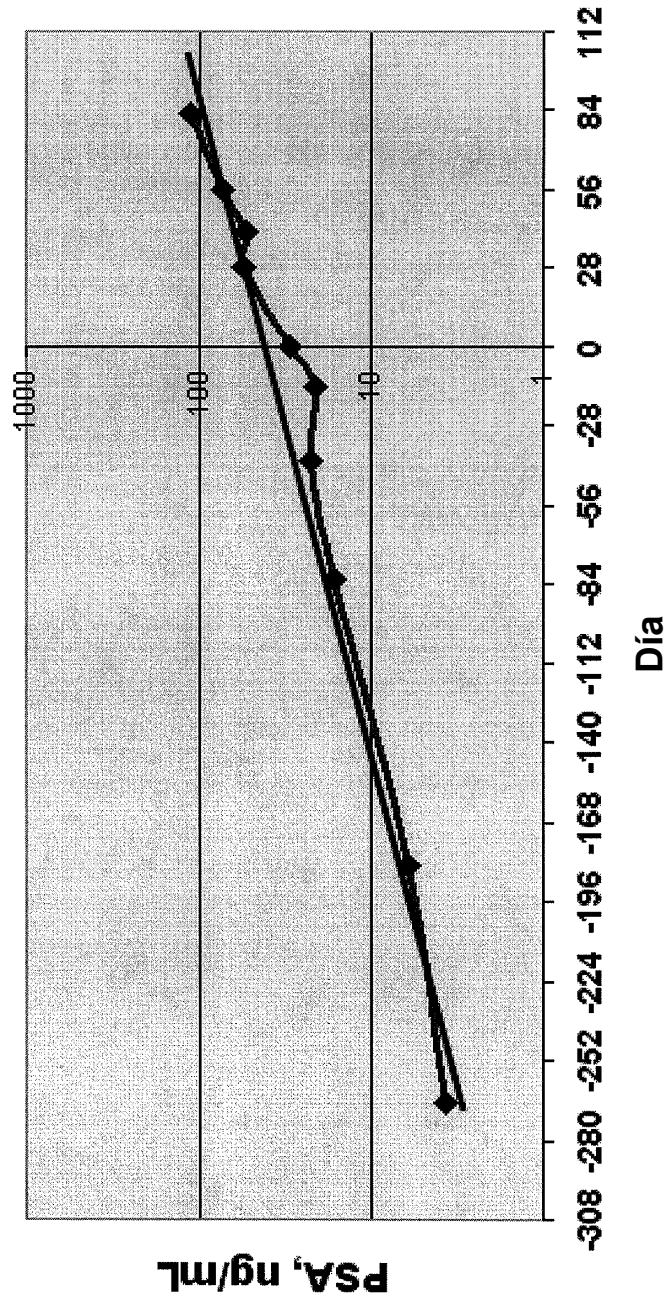


FIG. 3

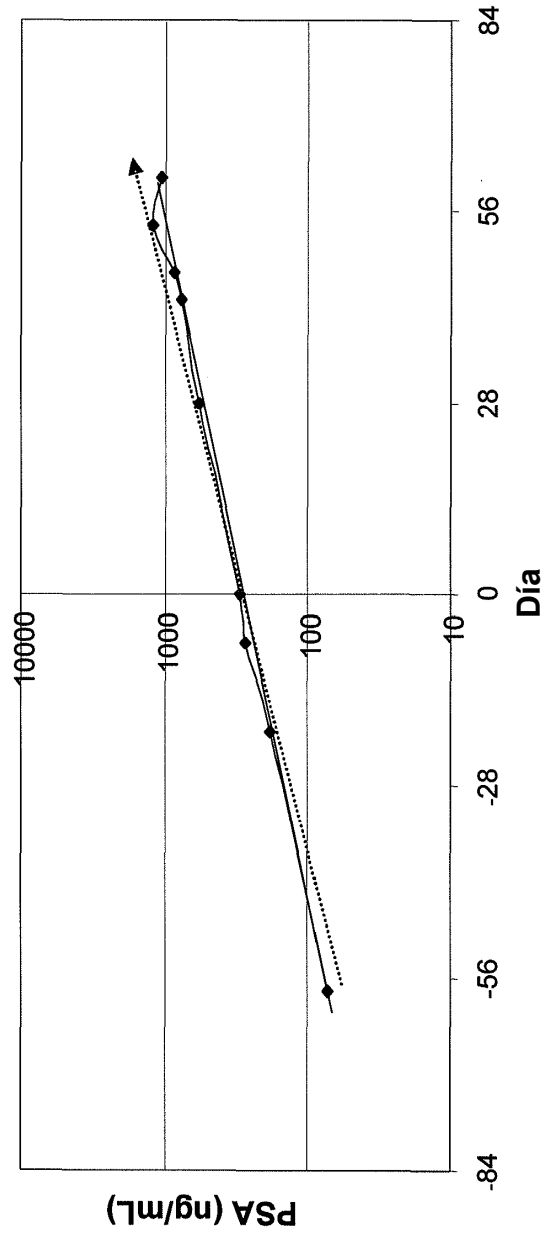
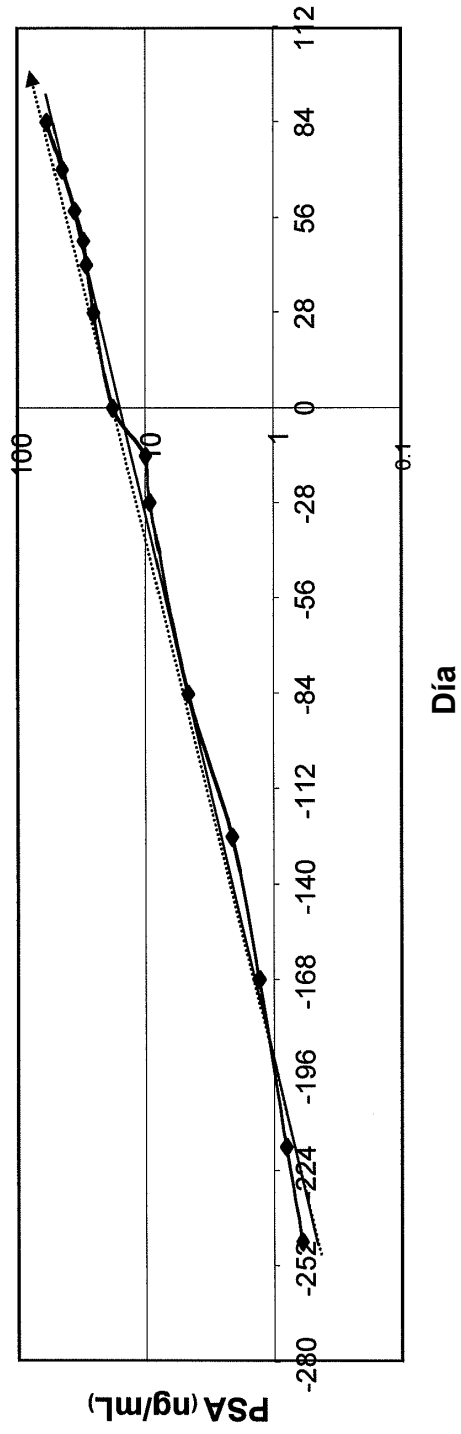




FIG. 4



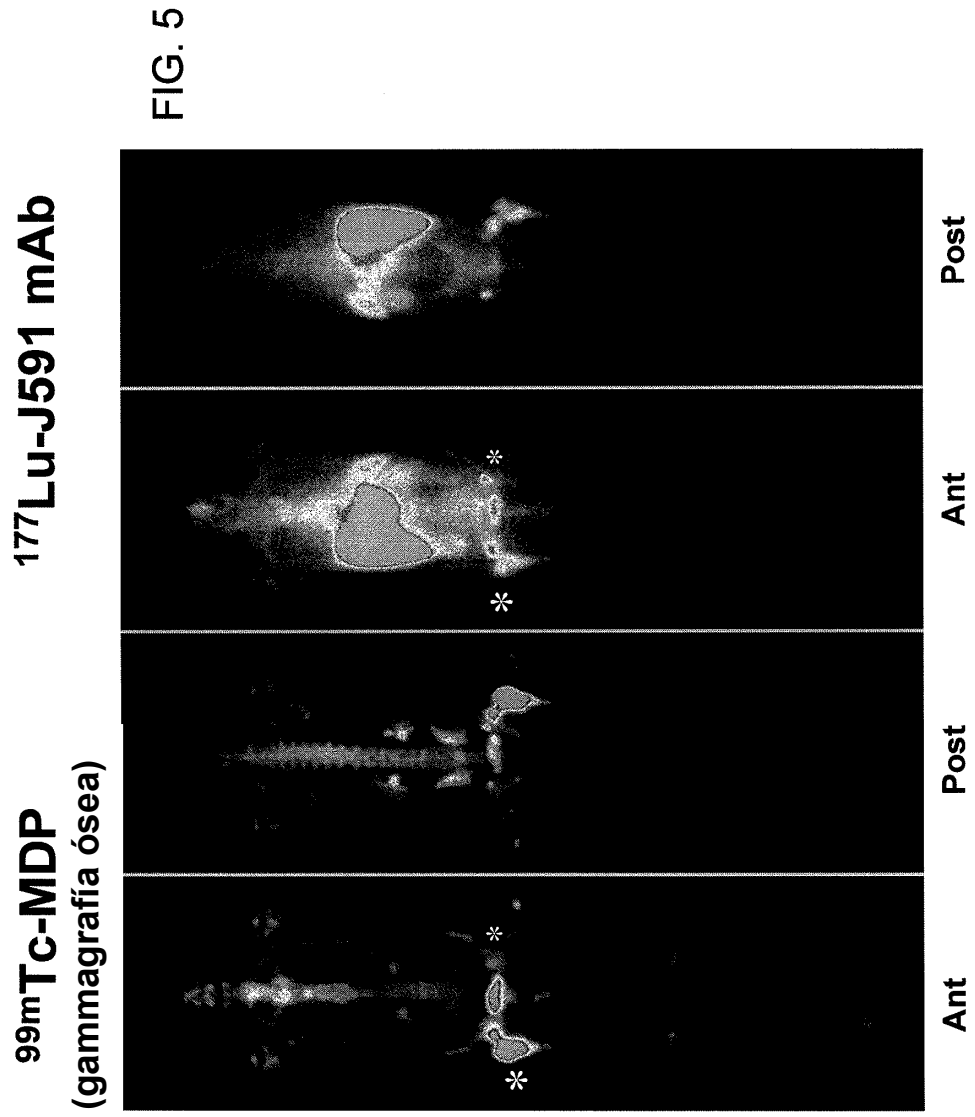
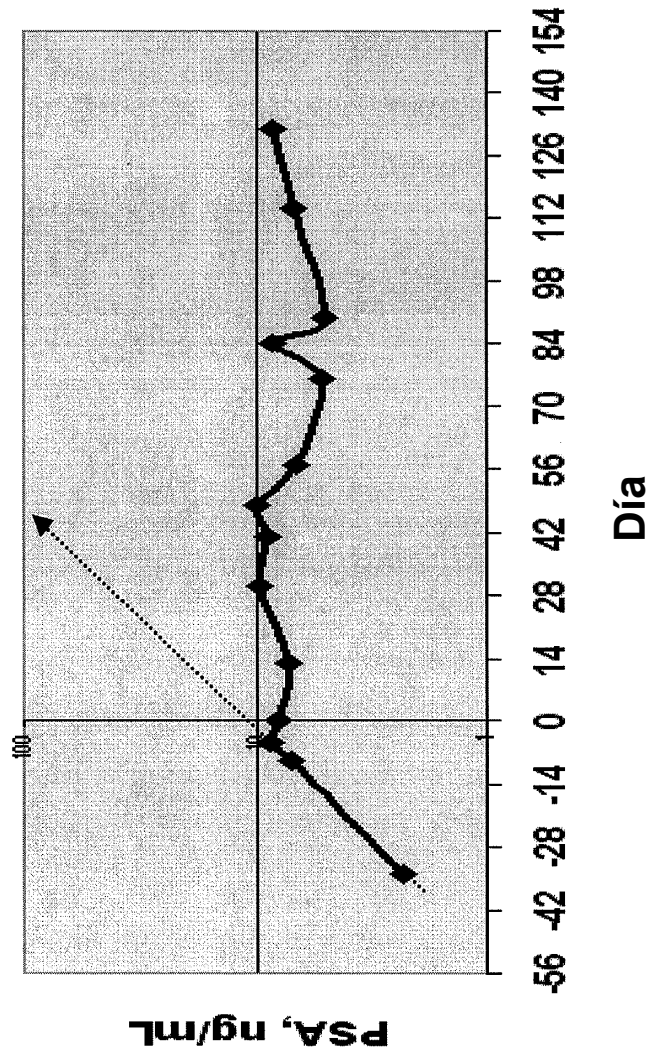


FIG. 6



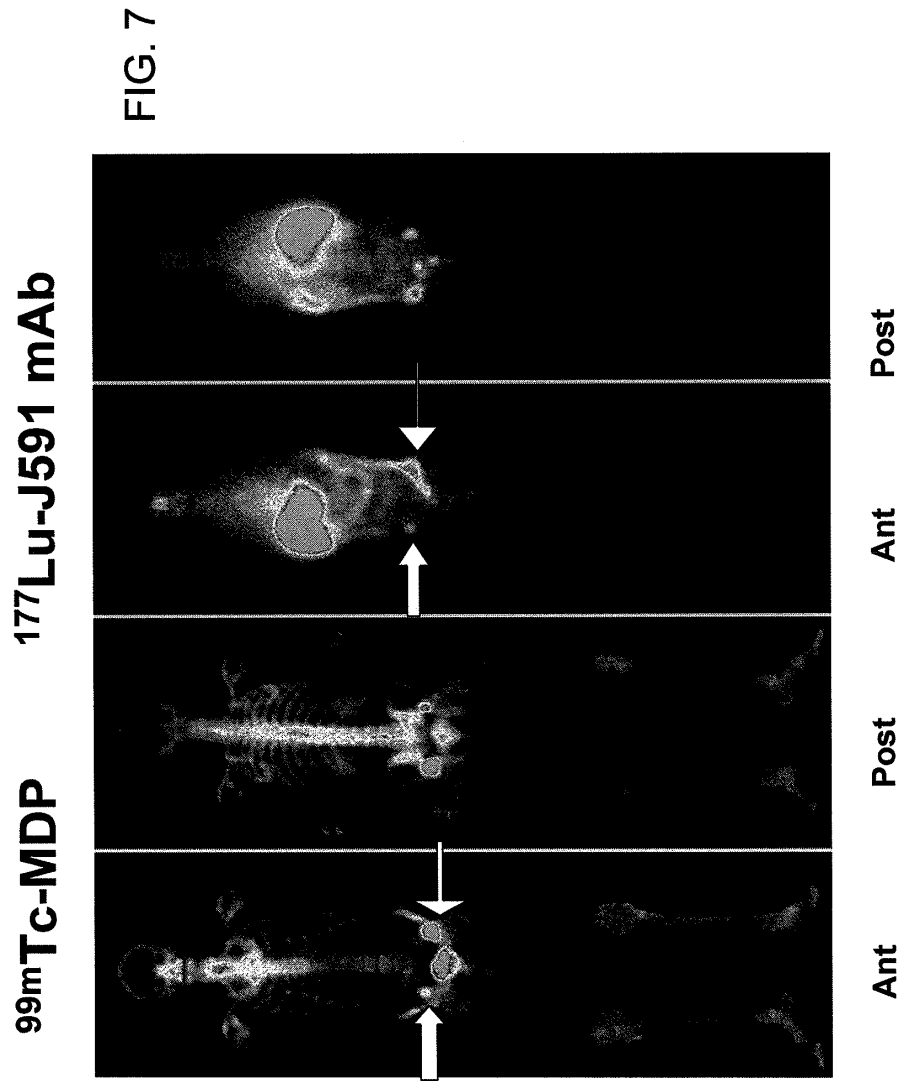


FIG. 8A

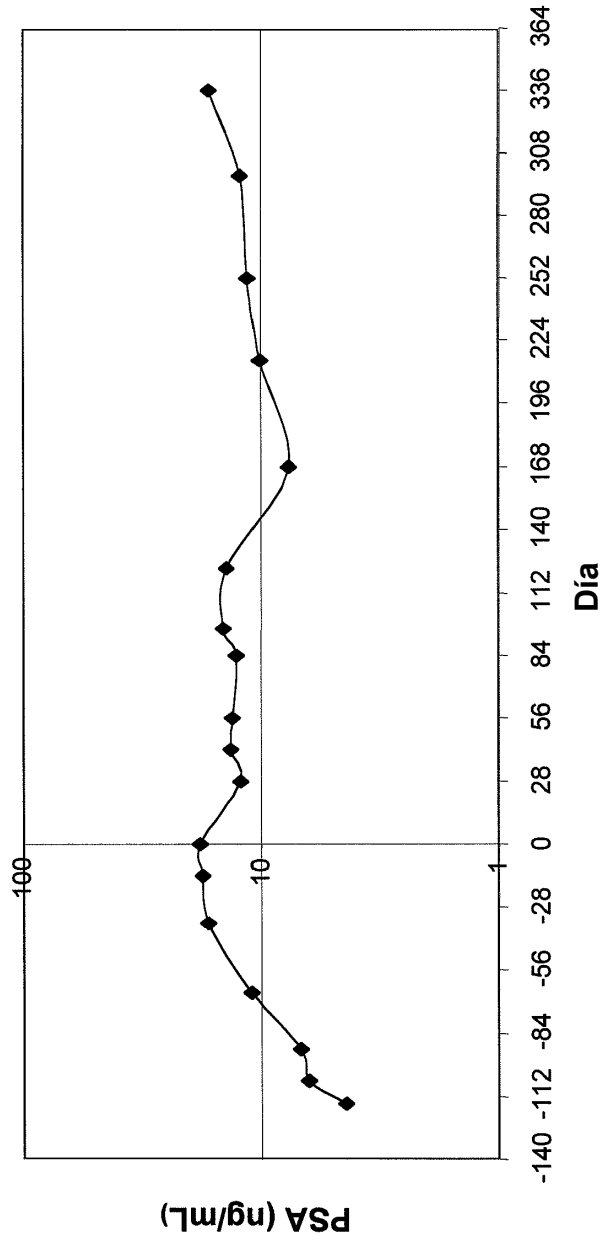
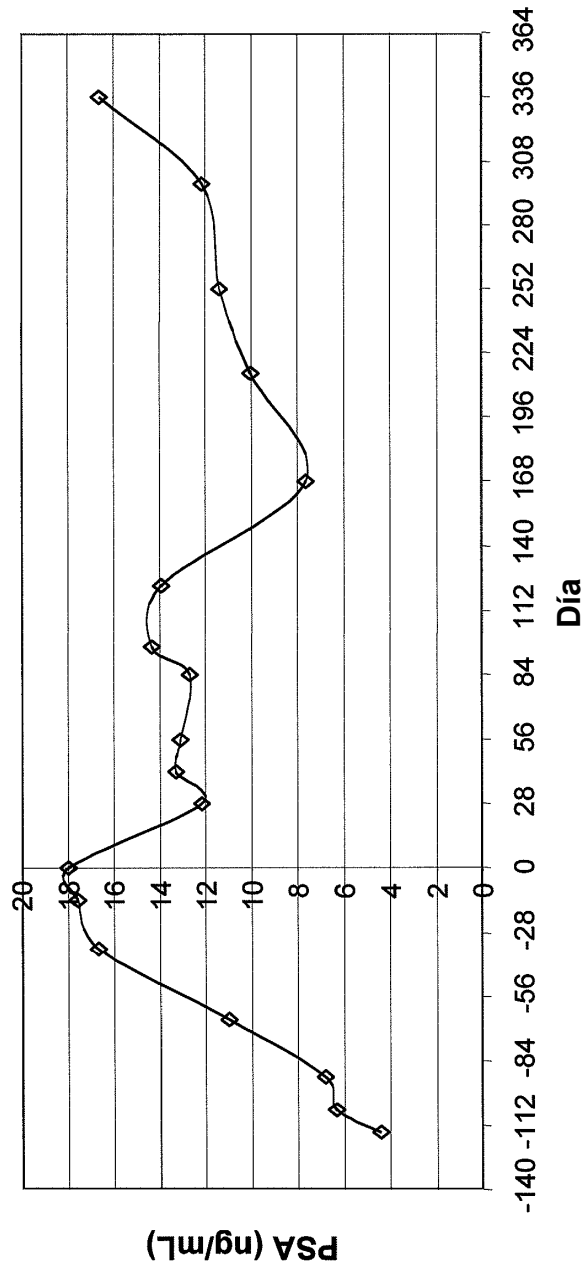
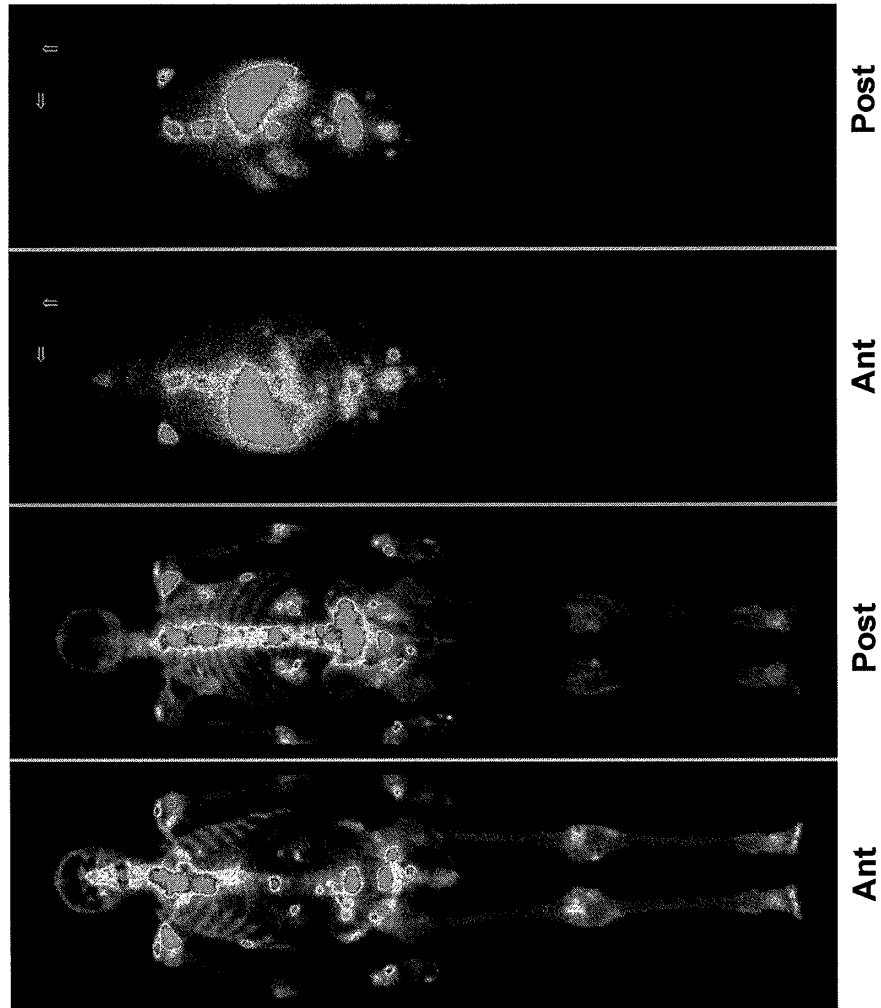


FIG. 8B



**$^{177}\text{Lu}$ -J591 mAb**



**FIG. 9**

FIG. 10A

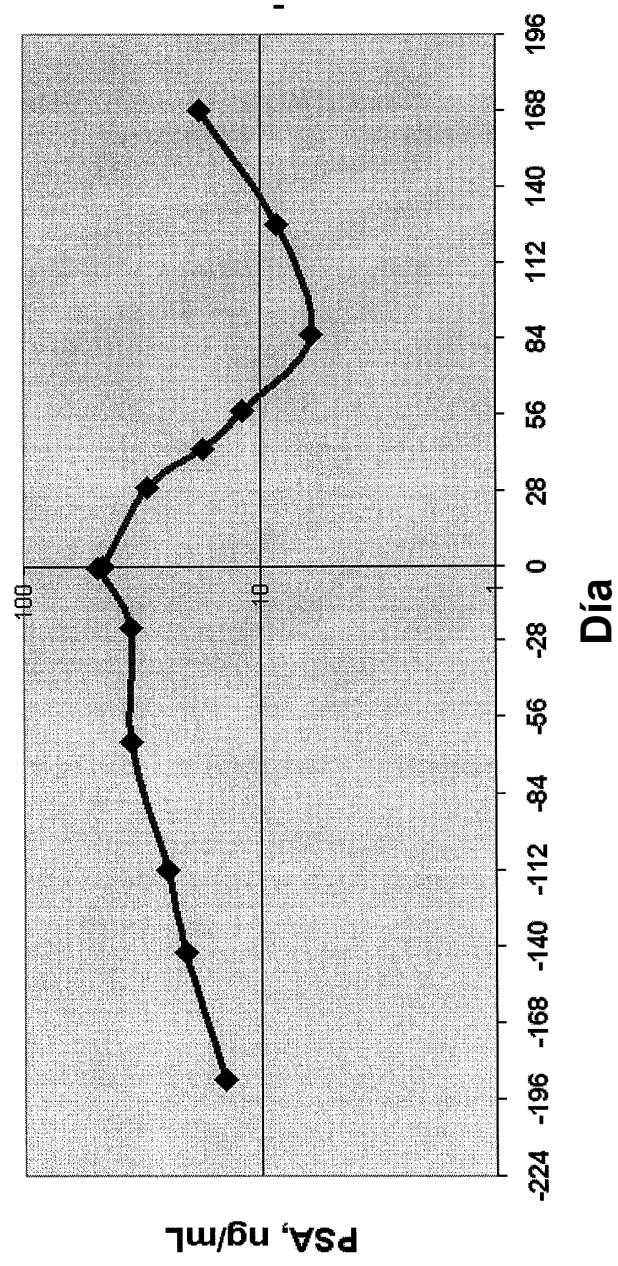




FIG. 10B

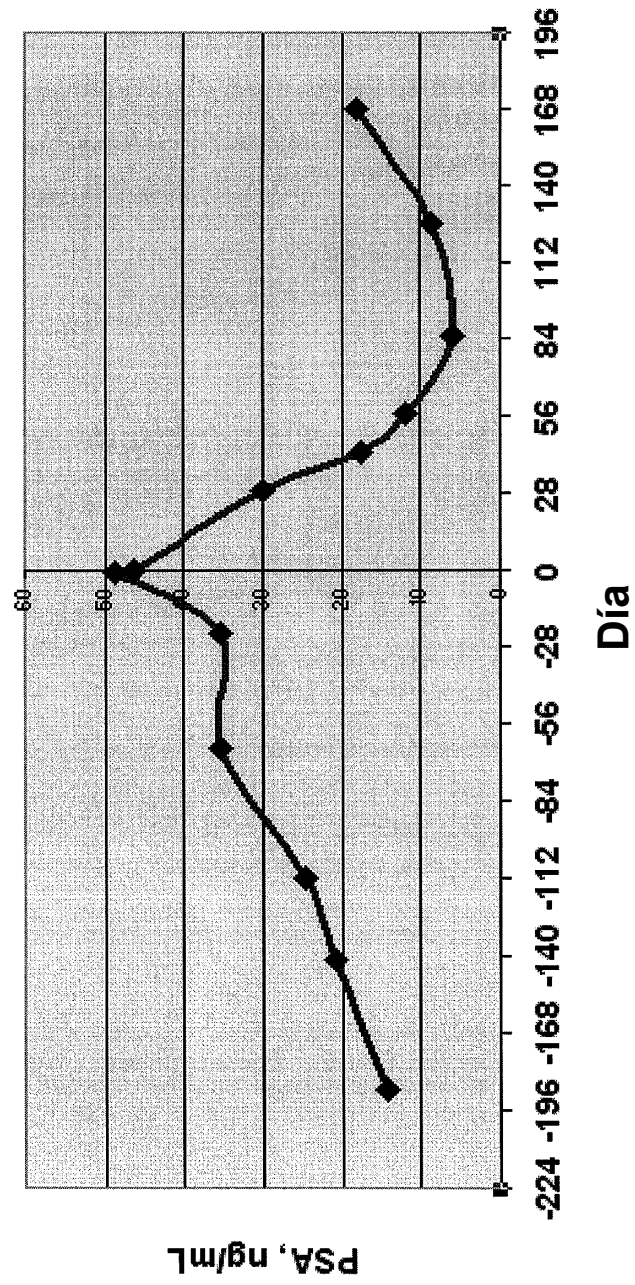


FIG. 11

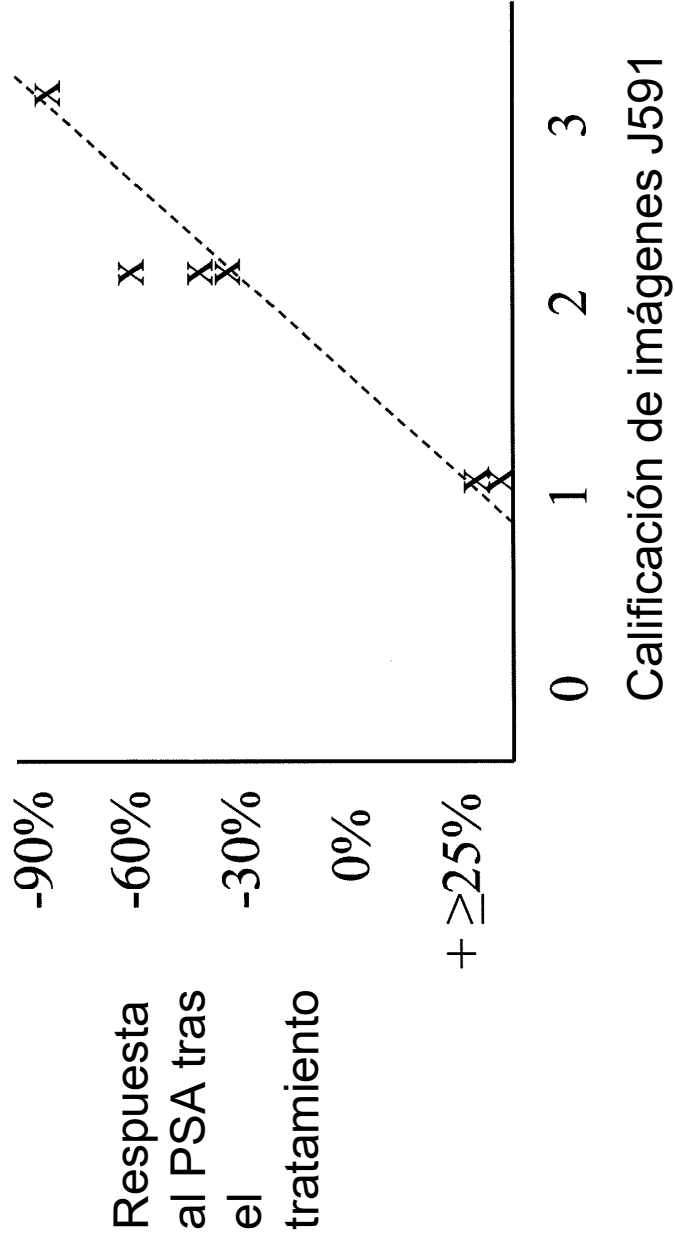
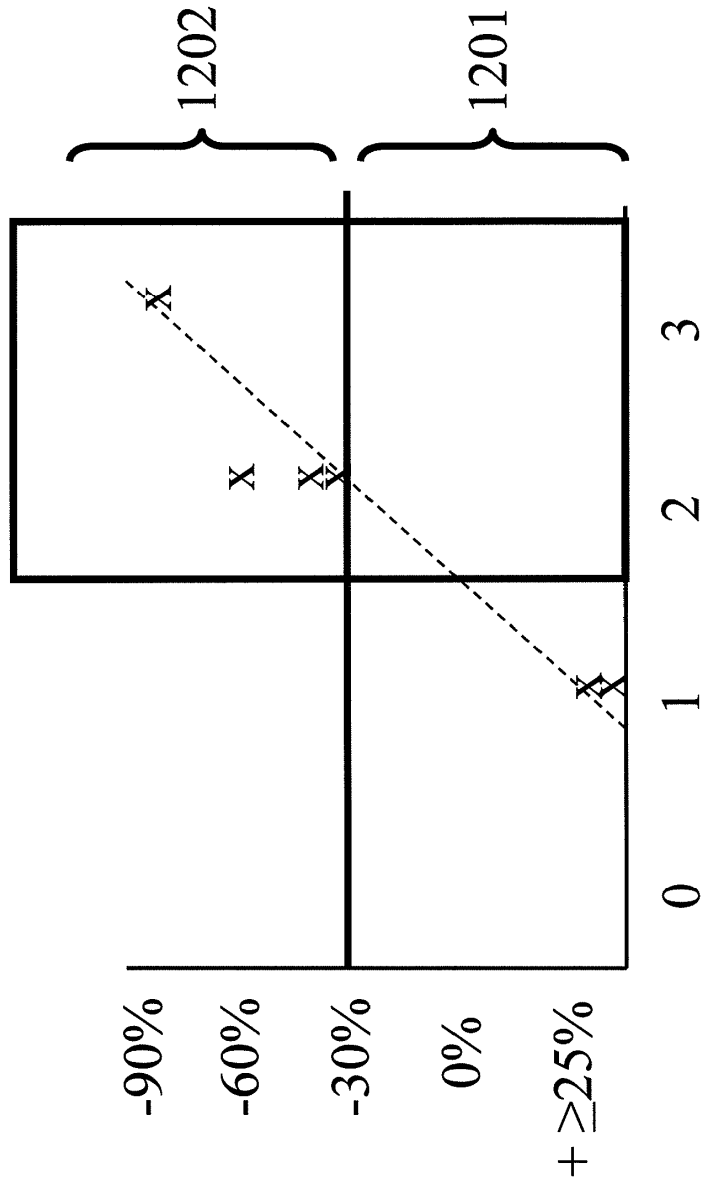


FIG. 12



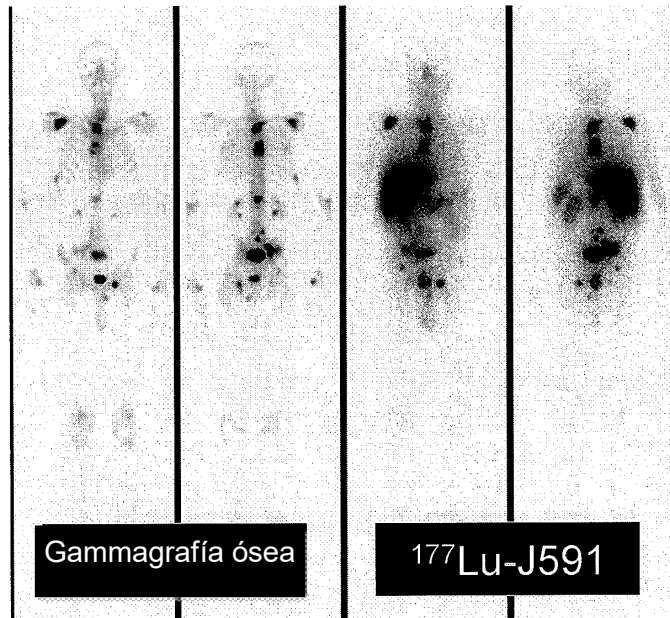


FIG 13A

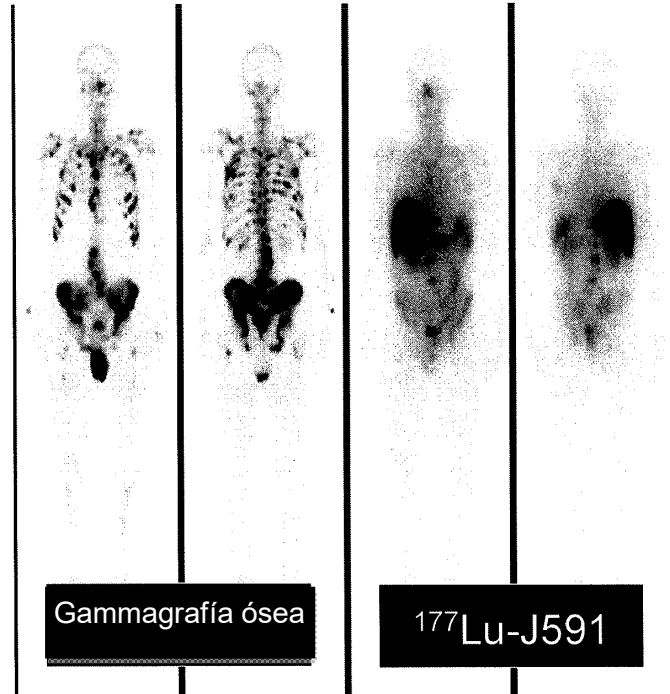


FIG 13B