



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 575**

51 Int. Cl.:
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06829145 .9**
96 Fecha de presentación : **27.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1962822**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Terapia de neoplasias malignas.**

30 Prioridad: **25.11.2005 EP 05025776**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2010

73 Titular/es: **Samuel Samnick**
Steinhübel 11
66424 Homburg/Saar, DE

72 Inventor/es: **Samnick, Samuel**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 341 575 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia de neoplasias malignas.

5 La presente invención proporciona una 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-fenilalanina para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una neoplasia maligna. Además, la invención proporciona un método para el tratamiento de una neoplasia maligna, método que comprende los pasos de administrar 3-yodo-fenilalanina o 4-yodo-fenilalanina a un sujeto en necesidad de la misma y una composición farmacéutica que comprende 3-yodo-fenilalanina o 4-yodo-fenilalanina.

10 A lo largo de esta especificación se citan varios documentos. El contenido de la divulgación de dichos documentos incluyendo los manuales de los fabricantes se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

15 Las neoplasias malignas avanzadas se caracterizan por una enfermedad localmente infiltrante y la formación de una o múltiples metástasis microscópicas o macroscópicas, locales o distantes. En la técnica se sabe que para tales neoplasias un fenómeno concomitante es el desarrollo de resistencia a pautas de quimioterapia convencional. Ejemplos son glioma maligno recurrente, cáncer de mama avanzado, cáncer de ovario avanzado, cáncer de próstata avanzado, melanoma maligno avanzado o mieloma múltiple. Estas neoplasias típicamente no son tratables mediante tratamiento local curativo, tales como por ejemplo, cirugía o terapia de radiación local, sino que en su lugar requieren la administración sistémica de agentes terapéuticos, típicamente de pautas quimioterapéuticas. Incluso el uso de agentes quimioterapéuticos, que contienen una combinación de diferentes agentes para impedir el desarrollo de quimiorresistencia a agentes individuales y para optimizar la tolerabilidad de las pautas normalmente muy tóxicas para pacientes falla en un número significativo de casos.

25 Las pautas de quimioterapia de primera línea establecidas para neoplasias avanzadas inducen en algunas entidades tumorales tasas de remisión completa de hasta el 10-20% [1-2]. Por el contrario, las tasas de respuesta de enfermedades repetitivamente recurrentes son mucho menores debido al desarrollo de quimiorresistencia inducible o selección de mutantes quimiorresistentes. Otros tumores, tales como los gliomas malignos son ante todo resistentes a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, debido bien a la farmacocinética (por ejemplo, la no penetración de la barrera hematoencefálica) o a la quimiorresistencia intrínseca. La quimiosensibilidad disminuida puede estar mediada por 30 mecanismos inducibles de detoxificación celular, tales como los productos génicos PgP, MDR y otros.

35 Las pautas de quimioterapia usadas para tratar cánceres de fase avanzada incluyen agentes alquilantes tales como melfalán, compuestos que contienen platino, inhibidores de la topoisomerasa o antimetabolitos de segunda línea, están asociadas con efectos extremadamente tóxicos en la médula ósea y otros órganos, lo que limita la administración terapéutica o paliativa [3-5].

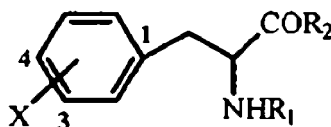
Se sabe que la mayoría de los tumores comparten la capacidad de acumular aminoácidos de forma más eficaz que los tejidos normales y tejidos no tumorales con patologías, tales como por ejemplo enfermedades inflamatorias. 40 Por lo tanto, se han usado aminoácidos radiomarcados para el diagnóstico por imágenes de tumores clínicamente, usando técnicas de medicina nuclear tales como tomografía de emisión de positrones y tomografía computarizada de emisión de fotón único [6]. La 4-yodo-L-fenilalanina (IPA) es un aminoácido yodado natural, que muestra una gran afinidad por tumores humanos. Su marcada acumulación en tumores está principalmente asociada con el aumento del transporte de aminoácidos a la célula neoplásica, que se ha mostrado que es específico para muchos tumores [7]. La 45 evaluación clínica inicial con el análogo marcado con yodo-123 4-[¹²³I]yodo-L-fenilalanina (IPA-123) demostró la eficacia y seguridad de la tomografía de emisión de fotón único (SPET) con IPA-123 para el diagnóstico por imágenes de tumores cerebrales [8, 9]. IPA-123 cruza según [8, 9] la barrera hematoencefálica después de la administración intravenosa y se acumula específicamente en gliomas malignos con retención prolongada en el tumor.

50 Se ha probado la actividad antineoplásica de una serie de derivados de aminoácidos en cribados antitumorales [10-15]. Incluyen las halobenzoil-DL-fenilalaninas, derivados N-cloroacetilo de fenilalaninas para-sustituidas, N-benzoil-fluorofenilalanina, p-cloro-DL-fenilalanina, α -metil-fenilalanina, N-etilcarbaminometil-L-isoleucina y N-propionil-L-valina, para nombrar solo algunos. Sin embargo, también se sabe que la administración de todos los compuestos de dicho grupo está asociada con efectos secundarios extremadamente tóxicos sobre la médula ósea y otros órganos, lo que limita su administración terapéutica o paliativa. Por ejemplo en la técnica se ha sabido desde 1974 que la p-cloro-fenilalanina interfiere con el crecimiento de ratas en desarrollo [16] lo que descalifica esta clase de compuestos como un compuesto potencial para el tratamiento de tumores malignos con un perfil de toxicidad aceptable. Además, la dosis eficaz de los compuestos descritos en el documento correspondiente era relativamente alta. Por ejemplo, en 55 [15] se describió que era necesaria una dosis de 2,5 a 10 mmol/l de p-cloro-fenilalanina (4-cloro-fenilalanina) para demostrar un efecto citotóxico del compuesto en neuroblastos murinos.

60 De esta manera, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar medios y métodos para un tratamiento mejorado de neoplasias malignas. La solución a este problema técnico se alcanza mediante las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

65 Según esto, la presente invención se refiere al uso de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una neoplasia maligna.

Yodo-L-fenilalanina en las formas aplicables según la presente invención se presenta mediante la fórmula general I:



Fórmula general I

En la que,

X es un yodo unido a L-fenilalanina en la posición 3- (meta) o la 4- (para-) del anillo aromático.

R₁ es H, grupo alquilo, aminoácido, péptido, proteína u otros residuos que se sabe que facilitan o mejoran el direccionamiento a tumores.

R₂ es OH, aminoácido u otros residuos que se sabe que facilitan o mejoran el direccionamiento a tumores.

La 3-yodo-L-fenilalanina también se puede designar meta-yodo-L-fenilalanina (IMA) y la 4-yodo-L-fenilalanina como para-yodo-L-fenilalanina (IPA).

Se prefiere que R₁ sea H y R₂ sea OH. Es además preferido que el yodo conjugado a la L-fenilalanina sea el isótopo estable, no radioactivo [¹²⁷I]-yodo.

El término “neoplasia maligna” describe en el contexto de la presente invención un cáncer, carcinoma, sarcoma u otro tumor, caracterizado por crecimiento progresivo, incontrolado, invasor y/o metastásico. Una neoplasia maligna produce invariablemente la muerte si no se trata.

Una indicación para la administración de una composición farmacéutica que comprende 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina a un sujeto con una neoplasia maligna también es el diagnóstico de enfermedad residual mínima, preferiblemente un tumor sólido temprano, tumor sólido avanzado o tumor sólido metastásico, que se caracteriza por la recurrencia local y no local del tumor producida por la supervivencia de células individuales.

Según esta invención, el término “composición farmacéutica” se refiere a una composición para la administración a un sujeto, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica se administra preferiblemente por vía oral, parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal o intravenosa. También se prefiere una inyección directa de la composición farmacéutica en el tejido maligno. En particular se prevé que dicha composición farmacéutica se administre a un paciente mediante infusión o inyección, o como un comprimido o cápsula. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar por vías diferentes, por ejemplo, mediante administración intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, tópica o intradérmica. La composición farmacéutica puede comprender además un soporte farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de soportes farmacéuticos aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite en agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Se pueden formular composiciones que comprenden tales soportes mediante métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La pauta posológica la determinará el médico y los factores clínicos. Como se sabe bien en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el compuesto particular a ser administrado, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se administren al mismo tiempo. Las dosis preferidas para la administración de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se describen aquí posteriormente. Las composiciones se pueden administrar de forma local o sistémica. La administración en general será parenteral, por ejemplo, intravenosa, u oral. En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea y en una forma de realización incluso más preferida por vía intravenosa. En otra forma de realización preferida, la composición farmacéutica se administra por vía oral. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas y no acuosas. Ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los soportes acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de líquido y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica podría comprender soportes proteicos, como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, preferiblemente

de origen humano. Se prevé que la composición farmacéutica pueda comprender, además de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica en un tratamiento que comprende la administración de agentes adicionales para una terapia concomitante. Los ejemplos para tales agentes biológicamente activos adicionales se describen aquí posteriormente en el contexto de usos y métodos que comprenden una terapia concomitante.

No se ha descrito en la técnica efecto farmacológico tal como un efecto citotóxico o radiosensibilizador de 3-yodo-L-fenilalanina (IMA) o 4-yodo-L-fenilalanina (IPA). Según los nuevos descubrimientos sorprendentes de la invención ya es detectable un efecto citotóxico de los derivados de fenilalanina identificados en todas las líneas de células malignas ensayadas para concentraciones en el intervalo de 0,1 a 0,3 $\mu\text{mol/ml}$, que se puede traducir aproximadamente en una dosis en seres humanos en el intervalo de 7 a 21 mmol/70 kg de peso corporal, correspondiente a una dosis de 2 a 6 g/kg de peso corporal, asumiendo una distribución uniforme en todo el cuerpo. Sin embargo, se ha mostrado que la 4-[^{123}I]yodo-L-fenilalanina está enriquecida en ciertos tumores en un factor de 20 y más, indicando potencialmente una dosis clínicamente eficaz de 100 a 300 mg/70 kg de peso corporal o de 1 a 5 mg/kg de peso corporal (8). Además, se ha encontrado sorprendentemente que tales derivados de fenilalanina son capaces de acumularse específicamente en gliomas de bajo y alto grado así como otras células/tejidos malignos que se pueden subsumir en la definición proporcionada anteriormente de neoplasia maligna. Por el contrario, la 2-yodo-L-fenilalanina, un ejemplo de un isómero orto de la 4-(para)yodo-L-fenilalanina (IPA) y los análogos halogenados de D-fenilalanina revelaron solamente una baja absorción y una citotoxicidad moderada en células neoplásicas comparados con IPA e IMA. Esto muestra el efecto superior de 3-yodo-L-fenilalanina y 4-yodo-L-fenilalanina en células y tejidos malignos comparados con otros compuestos.

La acumulación específica de 3-yodo-L-fenilalanina y 4-yodo-L-fenilalanina produce una retención sorprendentemente marcada en las células o tejidos malignos. De esta manera, la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina tiene un efecto citostático en tales células o tejidos malignos. Además, dichas L-fenilalaninas halogenadas tales como 4-yodo-L-fenilalanina (IPA) muestran actividades antitumorales marcadas y aumentan la radiosensibilidad en células de tumores primarios, incluyendo glioblastoma humano, cáncer de próstata, ovario y mama, mieloma múltiple y melanoma maligno.

Con respecto a la toxicidad de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina en la técnica se sabe que para 4-yodo-L-fenilalanina (IPA) la DL_{50} es $> 100 \text{ mg/kg}$ en ratas [9]. Se ha determinado en experimentos que la DL_{10} para IPA administrada mediante inyección i.p. como $> 27 \text{ mg/kg}$ en ratas. Además, la DL_{50} descrita para L-fenilalanina administrada mediante inyección i.p. es según el fabricante 5280 mg/kg en ratas. De esta manera, la toxicidad de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina está en una relación aceptable de efectividad contra toxicidad a niveles de dosis eficaces. Además, la capacidad de transporte para IPA en células tumorales no mostró saturación hasta 200 $\mu\text{mol/L}$, confirmando la capacidad relativamente alta del sistema de transporte también como vía para la terapia tumoral. Además de su actividad citostática se encontró que 3-yodo-L-fenilalanina y 4-yodo-L-fenilalanina ejercen un efecto radiosensibilizador intrínseco significativo, que potencia el efecto citocida de la radiación terapéutica administrada al mismo tiempo.

Según esto, dichas 3-yodo-L-fenilalanina y 4-yodo-L-fenilalanina representan una atractiva nueva clase de compuestos para fármacos terapéuticos para el tratamiento de tumores por lo que se puede concentrar una dosis citotóxica eficaz selectivamente en las células tumorales devastadoras, mientras que se salvan los tejidos normales. Además, la L-fenilalanina halogenada con yodo en las posiciones 3- (meta-) ó 4- (para-) son compuestos citostáticamente activos que muestran perfiles de tolerabilidad favorables. Una terapia que usa las L-fenilalaninas halogenadas 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina puede salvar por lo tanto las estrategias de detoxificación celular. Debido a la actividad antitumoral el compuesto es una alternativa para la terapia de mantenimiento o inducción en cánceres avanzados y para la mejora de la tolerabilidad y eficacia de pautas de quimioterapia existentes.

En un uso preferido de la invención la composición farmacéutica se va a administrar a un sujeto, en donde generalmente se administra 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina en una dosis de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Más preferiblemente, la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina está en una dosis de 0,1 a 25 mg/kg de peso corporal del sujeto y más preferiblemente, la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina está en una dosis de 1,0 a 25 mg/kg de peso corporal del sujeto.

Según un uso adicionalmente preferido de la invención la L-fenilalanina halogenada es 4-yodo-L-fenilalanina.

Se prefiere que la neoplasia maligna se seleccione del grupo que consiste en glioma maligno, mieloma múltiple, melanoma maligno, cáncer de próstata y de mama. Más preferiblemente, el glioma se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma multiforme, astrocitoma anaplásico, astroligodendroglioma, oligoastrocitoma y ependimoma.

Es además preferido para el uso de la invención que la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina tenga en las células malignas o tejido de la neoplasia un efecto radiosensibilizador, un efecto citostático y/o un efecto de anular un estado adquirido o constitutivo de resistencia a quimioterapia o radioterapia.

El término "efecto citostático" describe en el contexto de la presente invención la capacidad de un compuesto de disminuir o detener la proliferación celular de células malignas.

El término “efecto radiosensibilizador” describe en el contexto de la presente invención la capacidad de un compuesto para aumentar la respuesta terapéutica a terapia de radiación administrada de forma concomitante, en donde la terapia de radiación incluye terapia de radiación externa o interna, correspondiente a la inducción de una respuesta aumentada a una dosis de radiación determinada administrada en presencia del compuesto radiosensibilizador, comparada con la respuesta inducida por la misma dosis de radiación en ausencia del compuesto radiosensibilizador, o de forma alternativa la inducción selectiva de la sensibilidad de células neoplásicas para una radioterapia, no presente en ausencia del compuesto.

El término “un efecto para revertir un estado adquirido o constitutivo de resistencia celular a quimioterapia o radioterapia” describe en el contexto de la presente invención la capacidad de un compuesto de convertir o de reconvertir la sensibilidad celular para una quimioterapia o radioterapia.

Además, se prefiere que la composición farmacéutica contenga además un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, una vacuna, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip y/o un agente endorradioterapéutico.

La administración de un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, una vacuna, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip y/o un agente endorradioterapéutico se entiende como una terapia concomitante. Los métodos y medios para tales terapias concomitantes se conocen bien en la técnica.

La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina y el agente terapéutico adicional se pueden formular como una composición farmacéutica única para la administración simultánea de los compuestos eficaces o en composiciones farmacéuticas separadas para la administración secuencial. Según esto, se prevé la administración de una composición que comprende 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina antes de la administración de una composición que comprende uno o más agentes terapéuticos seleccionados de un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, una vacuna, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip y un agente endorradioterapéutico así como la administración simultánea o posterior.

Un ejemplo de agente quimioterapéutico comprende agentes bioactivos que se sabe que son eficaces en retrasar o detener el crecimiento maligno o que son eficaces en la regresión o eliminación de tejidos o células malignos. Tales agentes pueden ser, por ejemplo, fármacos que actúan como citostáticos. Según esto, una quimioterapia comprende en línea con los estándares médicos en cualquier tratamiento sistémico o local la administración de agentes citostáticos o citotóxicos. Los agentes quimioterapéuticos usados en oncología incluyen entre otros, compuestos de nitrosourea (ACNU [nimustina], BCNU [carmustina], CCNU [lomustina]), temozolomida, procarbamina, metotrexato, citarabina, gemcitabina, fluorouracilo, ciclofosfamida, mitoxantrona, antraciclinas, estramustina o taxanos. Se pretende administrar los agentes quimioterapéuticos en pautas posológicas adecuadas según la práctica médica. En línea con la invención los compuestos de nitrosourea, temozolomida, procarbamina y metotrexato son agentes quimioterapéuticos preferidos.

Los ejemplos de un agente inmunoterapéutico comprenden pero no están limitados a compuestos tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y/o derivados de los mismos que detectan específicamente tejido o células malignos y/o agentes terapéuticos celulares, incluyendo aquellos que consisten en células transferidas de forma adoptiva autólogas, heterólogas, xenógenas o endógenas, que tienen la capacidad de eliminar células o tejidos malignos. El término “fragmento de anticuerpo o derivado del mismo” refiere a anticuerpos de cadena sencilla, o fragmentos de los mismos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv o scFv, anticuerpos de dominio único, etc., o un derivado químicamente modificado de cualquiera de estos. Los anticuerpos a ser empleados según la invención o su(s) cadena(s) correspondiente(s) de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente fuera de los motivos usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) de aminoácidos y/o recombinación(es) y/o cualquier otra modificación (por ejemplo modificaciones postraduccionales y químicas, tales como glicosilación y fosforilación) conocidas en la técnica bien solas o en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina las conoce bien el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición 1989 y 3ª edición 2001. La detección específica de tejidos o células malignas se puede realizar mediante la detección de marcadores tumorales específicos mediante los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y/o derivados de los mismos. Un marcador específico de tumor es un antígeno de superficie celular asociado a un tumor que bien se encuentra exclusivamente en células tumorales o se sobreexpresa en células tumorales comparado con células no malignas. Los antígenos de superficie celular asociados a tumor se pueden expresar no solo en células tumorales sino también en células/tejido que no son/es esencial para la supervivencia o que se puede regenerar por células troncales que no expresan el antígeno de superficie celular asociado al tumor. Además, un antígeno de superficie asociado a tumor se puede expresar en células malignas y en células no malignas pero es más accesible mediante un agente terapéutico de interés en células malignas. Ejemplos de antígenos de superficie celular asociados a tumor sobreexpresados son Her2/neu, el receptor de EGF, Her-3 y Her-4. Un ejemplo de un antígeno de superficie celular asociado a tumor que es específico de tumor es EGFRV-III. Un ejemplo de un antígeno de superficie asociado a tumor que está presente en una célula que no es esencial para la supervivencia es PSMA. Los ejemplos de antígenos de superficie asociados a tumor que están presentes en células que se regeneran son CD19, CD20 y CD33. Un ejemplo de un antígeno de superficie celular asociado a tumor que es más accesible en un estado maligno que en un estado no maligno es EpCAM.

Además, la definición de “agente inmunoterapéutico” puede comprender agentes tales como moléculas coestimuladoras de células T o citoquinas, agentes activadores de células B, células NK u otras células del sistema inmune así como fármacos que inhiben las reacciones inmunes (por ejemplo, corticoesteroides).

El término “agente de terapia génica” define en el contexto de la invención medios para una terapia que comprende la administración de una o más construcciones de ácido nucleico que codifican funcionalmente, por ejemplo uno o más antígenos que son característicos de células malignas. Tales antígenos comprenden marcadores específicos de tumor. La secuencia que codifica tal antígeno está operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que es una secuencia reguladora. De esta manera, una terapia génica comprende la expresión funcional de un gen heterólogo en un paciente según protocolos médicos estándar usando sistemas de vectores apropiados conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Haberkorn *et al.*, Curr Med Chem. 2005; 12(7): 779-94. El término “secuencia reguladora” se refiere a secuencias de ADN que son necesarias para realizar la expresión de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias control en el contexto de la terapia génica descrita en general incluyen promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores, transactivadores o factores de transcripción. Se pretende que el término “secuencia control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes ventajosos adicionales. El término “operativamente unido” se refiere a una disposición/configuración en donde los componentes así descritos están en una relación que los permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia de control “operativamente unida” a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se alcanza en condiciones compatibles con las secuencias de control.

La administración de una vacuna tiene como fin en el contexto de la presente invención activar el sistema inmune innato a adaptativo del paciente para actuar contra el tejido tumoral o las células malignas. Tal terapia comprende, por ejemplo, administrar una o más preparaciones de antígenos que contienen sustancias tumorales o células seleccionadas para reaccionar contra el tejido tumoral o las células malignas.

Un agente terapéutico antisentido es por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que es complementaria a secuencias génicas específicas de tumor, cuyo fin es neutralizar funcionalmente la expresión de genes tumorales y por consiguiente inducir la muerte de células tumorales.

Un agente terapéutico ARNip es por ejemplo, un ARN interferente pequeño capaz de silenciar de forma específica de secuencia la expresión y actividad de varios genes diana específicos de tumor desencadenando el corte de secuencias específicas únicas en el transcrito de ARNm del gen diana y alterando la traducción del ARNm diana, induciendo por consiguiente la muerte de células tumorales.

Una terapia concomitante que requiere la administración de uno o más agentes bioactivos adicionales que es/son eficaces en el tratamiento de la neoplasia maligna puede estar acompañada por la administración de uno o más compuestos adicionales que minimizan los potenciales efectos secundarios de dicho(s) agente(s) bioactivo(s) tales como fármacos que actúan sobre el aparato digestivo, fármacos que previenen la hiperuricemia y/o fármacos que actúan en el aparato circulatorio, por ejemplo, sobre la presión sanguínea, conocidos en la técnica. Tales agentes bioactivos adicionales se pueden formular en forma de la misma composición farmacéutica o una separada.

El término “agente endorradioterapéutico” define en el contexto de la presente invención un agente que comprende al menos un tipo de isótopo radioactivo. Tal agente se va a administrar a un sujeto en necesidad del mismo y es eficaz en la terapia de la neoplasia maligna descrita anteriormente debido a una irradiación endógena, es decir, una irradiación con el compuesto radioactivo dentro del cuerpo del sujeto a ser tratado mediante la endorradioterapia.

En una forma de realización preferida la composición farmacéutica descrita comprende una combinación de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina, en donde el yodo es el isótopo estable no radioactivo [¹²⁷I]-yodo y un agente endorradioterapéutico que es una L-fenilalanina halogenada, en donde el isótopo de halógeno se selecciona del grupo de isótopos que emiten alfa, beta o electrones Auger bromo-76, bromo-77, bromo-82, yodo-123, yodo-124, yodo-125, yodo-131 y astato-211. Se prefiere, que el isótopo de halógeno también esté conjugado a la L-fenilalanina en la posición 3- (meta-) ó 4- (para-).

El término “isótopo que emite alfa, beta o electrones Auger” define en el contexto de la presente invención isótopos radioactivos, caracterizados por la emisión de diferentes partículas (rayos) formadas durante la desintegración radioactiva o mediante procesos de transición nuclear. Se define un isótopo que emite alfa como un núclido radioactivo que emite partículas alfa, correspondientes a un núcleo de helio que consiste en dos protones y dos neutrones. Se define un isótopo que emite beta como un núclido que emite electrones nucleares rápidos (negatrones) formados durante la desintegración radioactiva. Se define un isótopo que emite electrones Auger como un núclido que emite electrones nucleares de baja energía, formados mediante captura nuclear de electrones o procesos de transición interna. Las longitudes máximas de recorrido de estas partículas están en un intervalo de 10 nm a 12 nm.

El periodo de semidesintegración físico de los radionúclidos mencionados es de 16,2 horas para bromo-76, 57,04 horas para bromo-77, 35,3 horas para bromo-82, 13,27 horas para yodo-123, 4,17 días para yodo-124, 59,41 días para yodo-125, 8,02 días para yodo-131 o 7,21 horas para astato-211. El periodo de semidesintegración físico del conjugado de L-fenilalanina marcado con estos radionúclidos corresponde al periodo de semidesintegración del radionúclido respectivo.

La mezcla preferida de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina con un agente endorradioterapéutico es una mezcla, en donde el agente endorradioterapéutico es una L-fenilalanina halogenada. Preferiblemente, la mayoría de los isótopos estables de yodo y algunos isótopos de halógeno de la mezcla preferida seleccionados del grupo de isótopos de halógeno anteriormente identificados se pueden obtener por ejemplo, mediante un intercambio de halógeno no isotópico (soporte añadido/c.a.). De forma alternativa, se puede mezclar 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina que comprende sólo el isótopo estable no radioactivo [¹²⁷I]-yodo con una preparación de L-fenilalanina halogenada que comprende sólo o en una gran parte isótopos radioactivos no estables. La última preparación se puede obtener, por ejemplo, mediante una preparación sin soporte añadido (n.c.a) que está esencialmente libre de isótopos estables del elemento en cuestión. Mezclas alternativas adicionales de preparaciones estables no radioactivas con preparaciones radioactivas no estables son igualmente preferidas.

En general, se prefiere que el isótopo que emite alfa, beta o electrones Auger se administre en dosis de 10^{-5} a 10^{-8} g/kg de cuerpo. Más preferiblemente, el isótopo que emite alfa, beta o electrones Auger se administra en dosis de 10^{-7} a 10^{-15} g/kg de peso corporal y más preferiblemente en dosis de 10^{-8} a 10^{-10} g/kg de peso corporal. Es particularmente preferido que tal dosis se formule o esté contenida en 1 a 10, preferiblemente en 2 a 5 ml de solución estéril, tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua para inyección, etc.

Además es preferido que la dosis de irradiación del isótopo que emite alfa, beta o electrones Auger esté en el intervalo de 0,1 a 1000 MBq/kg de peso corporal. Más preferiblemente, la dosis de irradiación del isótopo que emite alfa, beta o electrones Auger está en el intervalo de 10 a 400 MBq/kg de peso corporal y más preferiblemente la dosis de irradiación del isótopo que emite alfa, beta o electrones Auger está en el intervalo de 20 a 120 MBq/kg de peso corporal. La dosis administrada se determina usando un dosímetro apropiado, calibrado para medir de forma cuantitativa radiación alfa, beta o gamma.

También se prefiere que la dosis de irradiación del isótopo que emite alfa, beta o electrones Auger se administre como una dosis única de una vez o como dosis fraccionadas en dosis de 2 a 60 fracciones o como dosis continua dada a diario hasta que la enfermedad progresa de nuevo o hasta la muerte del paciente. Como se ha descrito aquí anteriormente, la administración de la composición farmacéutica descrita produce una detención o una deceleración del desarrollo del cáncer debido al efecto citostático de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina. Sin embargo, la enfermedad puede progresar adicionalmente después de la detención o deceleración y el paciente puede morir.

Más preferiblemente, el conjugado se va a administrar en general fraccionado en dosis de 2 a 10 fracciones. También se prefiere que la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se administre como una terapia crónica de mantenimiento. Se prefiere que la dosis continua se dé a diario. El fraccionamiento de la dosis es un procedimiento establecido en terapia de radiación. Al fraccionar una dosis total administrada, se alcanza una tolerabilidad mejorada para el tejido sano no diana, así como un efecto citotóxico aumentado hacia el tejido tumoral. La irradiación fraccionada repetida permite impactar terapéuticamente un mayor porcentaje de células en fases del ciclo celular sensibles a radiación, comparado con una irradiación de una dosis alta única de una vez. La irradiación terapéutica induce roturas de cadena sencilla y doble del ADN, que se contrarresta por mecanismos de reparación nuclear aumentados después de la irradiación. Se cree que las células sometidas a reparación de ADN son más susceptibles a una irradiación renovada que las células no sometidas a radiación.

En una forma de realización preferida adicional los isótopos radiactivos de halógenos son p-[¹³¹I]yodo-L-fenilalanina (IPA-131), 4-[¹²⁴I]yodo-L-fenilalanina (IPA-124) y/o p-[²¹¹At]astato-L-fenilalanina (AtPA-211). El yodo-131 está ampliamente disponible, tiene un periodo de semidesintegración favorable y se puede manejar en la mayoría de las instituciones autorizadas para aplicar radionúclidos abiertos. El yodo-131 permite el seguimiento conveniente de terapia extracorpórea usando una cámara gamma debido a un componente de rayos gamma, emitido en una relación fija relativo a la emisión de la partícula beta terapéutica, que en sí misma no es detectable de forma extracorpórea. Otra forma de realización preferida del método de la invención hace uso de 4-[¹²⁴I]yodo-L-fenilalanina. El yodo-124 tiene un componente de emisión de positrones, que permite el diagnóstico por imágenes de PET, además de la emisión beta terapéutica. Al usar diagnóstico por imágenes de PET cuantitativo, se pueden realizar medidas dosimétricas internas regularmente para la planificación de la terapia y el seguimiento de la terapia durante un periodo de hasta 15 días después de una inyección única. También se prefiere el astato-211, ya que emite partículas alfa de alta energía (6,8 MeV), con una longitud de recorrido corta en tejido (65 μ m), lo que permite administrar una radiación altamente citotóxica al tejido diana, mientras que se minimiza los efectos de radiación indeseables al tejido no diana.

Se prefiere para el uso de la invención que la composición farmacéutica se vaya a administrar a un paciente y que este paciente posteriormente sea irradiado por vía percutánea (radioterapia percutánea o terapia de radiación de campo externo). Tal terapia de radiación de campo externo se entiende en el contexto de la invención como una terapia concomitante.

La terapia de radiación de campo externo típicamente se administra como una radiación de haz externo que procede, entre otros, de fuentes de cobalto-60 radioactivo, aceleradores lineales, fuentes de haces de protones, neutrones o hadrones. Preferiblemente, la irradiación se inicia en un periodo de 0 a 7 días posterior a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina. Más preferiblemente, la irradiación se inicia en un periodo de 0,5 a 24 horas posterior a la administración de la yodo-L-fenilalanina.

La radioterapia concomitante puede comprender una irradiación externa acumulada de un paciente en una dosis de 1 a 100 Gy. Un intervalo preferido de la dosis de irradiación es de 1 a 60 Gy. Se prefiere que la dosis de irradiación externa se administre en 1 a 60 dosis fraccionarias, más preferiblemente en 5 a 30 dosis fraccionarias. Preferiblemente las dosis fraccionadas se administran durante un periodo de 1 a 26 semanas, más preferiblemente durante un periodo de 6 a 12 semanas. Según la presente invención, se debe entender que el término “dosis fraccionaria” significa que la actividad total de la dosis fraccionaria se añade o esencialmente se añade a la irradiación externa acumulada alcanzable también de otra manera mediante la administración de una dosis única.

En una forma de realización alternativa la invención proporciona un método para el tratamiento de una neoplasia maligna, el método comprende los pasos de administrar 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina a un sujeto en necesidad de la misma.

Se prefiere que el principio activo 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se formule en forma de una composición farmacéutica. El término “composición farmacéutica” se ha definido aquí anteriormente. La vía de administración del principio activo depende, entre otros, de su formulación. Se han descrito aquí anteriormente diferentes vías para composiciones formuladas de forma diferente. Es particularmente preferido para el método de la invención que la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se administre por vía intravenosa u oral.

Es además preferido que la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se administre al sujeto en una dosis de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Más preferiblemente, la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se administra en una dosis de 0,1 a 25 mg/kg de peso corporal del sujeto y más preferiblemente, la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina está en una dosis de 1,0 a 25 mg/kg de peso corporal del sujeto.

También es preferido para el método para el tratamiento de una neoplasia maligna de la invención la administración de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina a un sujeto en necesidad de la misma, en donde la L-fenilalanina halogenada es 4-yodo-L-fenilalanina.

Como se ha definido aquí anteriormente, se prefiere que la neoplasia maligna se seleccione del grupo que consiste en glioma maligno, mieloma múltiple, melanoma maligno, cáncer de próstata y de mama. Más preferiblemente, el glioma se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, astrocitoma, oligoastrocitoma y ependimoma.

También se prefiere para el método de la invención que la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina tenga en las células malignas o tejido de la neoplasia un efecto radiosensibilizador, un efecto citostático y/o un efecto de anular un estado adquirido o constitutivo de resistencia celular a quimioterapia o radioterapia.

Un esquema de administración preferido para la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina es la administración de una dosis única de una vez o una administración secuencial de 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina como dosis fraccionadas en dosis de 2 a 60 fracciones o una dosis continua que se da hasta que la enfermedad progresa de nuevo o hasta la muerte del paciente/sujeto. De esta manera, también se prefiere que la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se administre como una terapia crónica de mantenimiento. Se prefiere que la dosis continua se dé a diario.

En una forma de realización también preferida del método de la invención para el tratamiento de una neoplasia maligna se prevé que el método comprenda además el paso de tratar al sujeto mediante una terapia concomitante. Dicha terapia concomitante se puede seleccionar del grupo que consiste en una terapia quirúrgica, una quimioterapia, una endo- o exorradioterapia, una inmunoterapia, una terapia génica, una terapia de vacuna, una terapia de nucleótido antisentido, una terapia de ARNip, una terapia intracavitaria o un tratamiento basado en un dispositivo.

Las definiciones para una quimioterapia, una endorradioterapia o terapia de radiación de campo externo (en lo sucesivo: exorradioterapia), una inmunoterapia, una terapia génica, una terapia de vacuna, una terapia de nucleótido antisentido y una terapia de ARNip se han proporcionado aquí anteriormente.

Los métodos y medios para tales terapias concomitantes se conocen bien en la técnica. Un ejemplo para una terapia quirúrgica puede comprender una recesión de un tumor sólido o de tejido maligno.

Una terapia concomitante adicional en línea con la invención comprende la implantación quirúrgica de un dispositivo radioactivo tal como una semilla radioactiva. Tal semilla se puede implantar localmente cerca del sitio del tumor. La técnica de implantar dispositivos radioactivos se conoce en la técnica y se ha descrito aquí anteriormente en la discusión del estado de la técnica.

La pauta posológica para la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina es preferiblemente oportuna según la terapia concomitante opcional (por ejemplo, una terapia concomitante de radiación de campo externo o una endorradioterapia concomitante). También se prefiere que se administre la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina como una terapia crónica de mantenimiento que se da en combinación con otros agentes a un paciente de tumor hasta que la enfermedad progresa de nuevo o hasta la muerte del paciente.

Como se ha descrito anteriormente en el contexto del uso de la invención, se prefiere un método de la invención, en donde la terapia concomitante es una exorradioterapia que comprende el paso de irradiar al sujeto por vía percutánea

posteriormente a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina. Más preferiblemente, el paso de irradiar se realiza de 0 a 7 días posterior a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina. Incluso más preferiblemente, la irradiación se inicia en un periodo de 0,5 a 24 horas posterior a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina.

La radioterapia concomitante descrita anteriormente puede comprender una irradiación externa acumulada de un paciente en una dosis de 1 a 100 Gy. Un intervalo preferido de la dosis de irradiación es de 1 a 60 Gy. Se prefiere que la dosis de irradiación externa se administre en 1 a 60 dosis fraccionarias, más preferiblemente en 5 a 30 dosis fraccionarias. Preferiblemente, las dosis fraccionadas se administran durante un periodo de 1 a 26 semanas, más preferiblemente durante un periodo de 6 a 12 semanas. Según a presente invención, se debe entender que el término “dosis fraccionaria” significa que la actividad total de la dosis fraccionaria se añade o esencialmente se añade a la irradiación externa acumulada alcanzable también de otra manera mediante la administración de una dosis única.

También se prefiere que la terapia concomitante descrita anteriormente comprenda la administración de un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip, una vacuna y/o un agente endorradioterapéutico o la implantación de un dispositivo radioactivo. Más preferiblemente, la administración de un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip, una vacuna y/o un agente endorradioterapéutico se realiza antes de, de forma simultánea y/o posterior a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina.

Se prefiere que el sujeto a ser tratado mediante el método de la invención sea un sujeto humano.

En una forma de realización alternativa adicional la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina, en donde el yodo es el isótopo estable no radioactivo [¹²⁷I]-yodo.

Las composiciones farmacéuticas en el contexto de la presente invención se han descrito en detalle aquí anteriormente. Se prefiere que la composición farmacéutica de la invención comprenda además formulaciones adecuadas de soporte, estabilizantes y/o excipientes. Ejemplos para soportes, estabilizantes y/o excipientes correspondientes los conoce el experto en la materia y se han caracterizado aquí anteriormente.

Las figuras muestran:

Figura 1

Cinética de la absorción celular de IPA (IPA-123) en líneas celulares de glioma humano in vitro

Figura 2

Cinética de la absorción celular de IPA (IPA-123) en líneas celulares de melanoma maligno humano in vitro

Figura 3

Cinética de la absorción celular de IPA (IPA-123) en líneas celulares de cáncer de próstata humano in vitro

Figura 4

Evaluación in vitro de IPA (ACD-101) en células de glioblastoma humano Tx3868

4a (arriba izquierda): Efecto citostático dependiente de la dosis de IPA en células de glioblastoma humano Tx3868; 4b (arriba derecha): Efecto de diferentes dosis de radiación externa sobre células de glioblastoma humano Tx3868 solas; 4c (abajo izquierda): Efecto radiosensibilizador dependiente de la dosis de IPA administrada de forma concomitante con 5 Gy de radiación externa en células de glioblastoma humano Tx3868; 4d (abajo derecha): Efecto radiosensibilizador dependiente de la dosis de IPA administrada de forma concomitante con 10 Gy de radiación externa en células de glioblastoma humano Tx3868.

Figura 5

Evaluación in vitro de IPA(ACD-101) y radiación externa en células de glioblastoma humano A1207

5a (arriba izquierda): Efecto de diferentes dosis de radiación externa en células de glioblastoma humano A1207 solas; 5b (arriba derecha): Efecto citostático y radiosensibilizador de IPA 0,1 mg/ml administrada de forma concomitante con 0-15 Gy de radiación externa en células de glioblastoma humano A1207; 5c (abajo izquierda): Efecto citostático y radiosensibilizador de IPA 0,2 mg/ml administrada de forma concomitante con 0-15 Gy de radiación externa en células de glioblastoma humano A1207; 5d (abajo derecha): Efecto citostático y radiosensibilizador de IPA 0,3 mg/ml administrada concomitante con 0-15 Gy de radiación externa en células de glioblastoma humano A1207.

Figura 6

Evaluación in vitro de IPA(ACD-101) en células de glioblastoma humano M059K

- 5 6a (arriba izquierda): Efecto de diferentes dosis de radiación externa en células de glioblastoma humano M059K
solas; 6b (arriba derecha): Efecto citostático y radiosensibilizador de IPA 0,1 mg/ml administrada de forma con-
comitante con 0-15 Gy de radiación externa en células de glioblastoma humano M059K; 6c (abajo izquierda): Efecto
citostático y radiosensibilizador de IPA 0,2 mg/ml administrada de forma concomitante con 0-15 Gy de radiación ex-
terna en células de glioblastoma humano M059K; 6d (abajo derecha): Efecto citostático y radiosensibilizador de IPA
10 0,3 mg/ml administrada de forma concomitante con 0-15 Gy de radiación externa en células de glioblastoma humano
M059K.

Figura 7

- 15 *Inducción dependiente de la dosis de necrosis primaria y apoptosis por IPA + irradiación externa (10 Gy) en células
de glioblastoma humano T3868*

Efecto radiosensibilizador dependiente de la dosis de IPA administrada de forma concomitante con 10 Gy de
radiación externa en células de glioblastoma humano Tx3868: inducción de necrosis (tinción de yodobenzimida) por
20 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ (Fig. 7a (izquierda)), inducción aumentada de necrosis e inducción adicional de apoptosis (tinción de
yoduro de propidio) por 0,3 $\mu\text{mol/ml}$ (Fig. 7b (derecha)).

Figura 8

- 25 *Estimados de supervivencia de Kaplan-Meyer en ratas RNU que recibieron una implantación ortotópica (intrace-
rebral) de $0,5 \times 10^6$ células A1207, una línea celular de glioblastoma humano. Supervivencia de animales control
(verde) y ratas que recibieron 1 mg/kg a diario inyección i.p. de IPA*

La invención se describirá ahora mediante referencia a los siguientes ejemplos que son únicamente ilustrativos y
30 no se deben interpretar como una limitación del ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1

Se adquirieron 3-yodo-L-fenilalanina (3-IPA), 4-[^{125}I]yodo-L-fenilalanina y 4-yodo-L-fenilalanina (IPA) usadas
35 en los ejemplos de forma comercial o se sintetizaron antes como se describe previamente en la bibliografía. A menos
que se especifique de otra manera, el resto de los productos químicos y solventes fueron de grado analítico.

Ejemplo 2

40 *Líneas celulares y cultivos celulares*

Se investigaron cinco líneas celulares de glioma humano, una línea celular de glioma de rata, dos líneas celulares
de cáncer de próstata humano, así como una línea celular de cáncer de mama humano y una línea celular de melanoma.
Las líneas celulares de glioma humano Tx 3868 y T 5135 (de glioblastoma multiforme primario humano) y las células
45 de glioma de rata C6 fueron suministradas por el Instituto de Genética Humana, Universidad del Sarre (Homburg, Ale-
mania). Las células de glioma humano de alto grado, designadas A1207, M059K y U373MG, las células de cáncer de
próstata humano PC3 y DU425, la línea celular de carcinoma pancreático PanC1, la línea celular de cáncer de mama
humano MCF-07 (Colección americana de cultivos tipo, Rockville, MD) y la línea celular de carcinoma pancreático
PaCa44 (establecida por el Dr. Bulow, Mainz, Alemania) así como la líneas celulares de melanoma SK-MEL25 y
50 A101D se adquirieron comercialmente o fueron suministradas por el laboratorio de investigación oncológica del Cen-
tro Médico de la Universidad del Sarre (Homburg, Alemania). Las células se cultivaron en medio RPMI o medio de
Eagle modificado por Dulbecco (sin piruvato de sodio, suplementado con L-glucosa y piridoxina), respectivamente,
suplementados con suero fetal de ternera (SFT) inactivado por calor al 10% (v/v), penicilina (50 U/ml), estreptomici-
na (50 $\mu\text{g/ml}$) e insulina (50 $\mu\text{g/ml}$; PromoCell, Heidelberg, Alemania). Todas las líneas celulares se mantuvieron en
55 botellas adecuadas en un incubador humidificado (CO_2 al 5%) a 37°C. Antes del experimento, se tripsinizaron cultivos
celulares subconfluentes con una solución de tripsina al 0,05% que contenía EDTA al 0,02% pero sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} ,
y se resuspendieron en medio fresco a varias concentraciones celulares después de contar mediante tinción vital en
un hemocitómetro, dependiendo del estudio. Las células estaban libres de micoplasma. La viabilidad de las células
era > 95%.

60

Ejemplo 3

Ejemplo de experimentos de internalización

65 Se emprendieron experimentos de absorción para evaluar la afinidad de los derivados de L-fenilalanina propuestos
para los tumores humanos propuestos y para evaluar su actividad terapéutica *in vitro*.

ES 2 341 575 T3

Todos los experimentos se realizaron cuatro veces, simultáneamente con 250000, 500000 y 10^6 células tumorales humanas recién preparadas, incluyendo células de glioma maligno humano, células de cáncer de páncreas, próstata y mama. Antes de los experimentos, se tripsinizaron células subconfluentes como se ha descrito anteriormente. La suspensión se mezcló por completo, se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml (Falcon®, Becton Dickinson, EE. UU.). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a $200 \times g$, el sobrenadante resultante se eliminó y el precipitado se resuspendió en medio de Eagle modificado por Dulbecco sin suero y luego se transfirieron tubos Eppendorf a concentraciones de 10^6 células/ml para las investigaciones de absorción.

Antes de la incubación con la fenilalanina radiomarcada correspondiente, las células tumorales se preincubaron durante 5 minutos en $500 \mu\text{L}$ de medio a 37°C en tubos de centrifuga Eppendorf de 1,5 ml. Se añadieron alícuotas de $30\text{-}50 \mu\text{L}$ ($10^6\text{-}1,5 \times 10^6$ cpm) de radiofármaco recién preparado y las células se incubaron a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ al 5% durante 1, 2, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos mientras se agitaba. La absorción se detuvo con $500 \mu\text{L}$ de PBS helado (pH 7,4) y 3 minutos adicionales en un baño de hielo, las células se centrifugaron durante 2 minutos a $300 \times g$, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó tres veces con PBS helado. Se contó la radioactividad de los precipitados celulares junto con 3 alícuotas de patrones en un contador Berthold LB951. Se calculó el porcentaje de unión del radiofármaco mediante la fórmula: (cpm del precipitado celular/cpm media de los patrones radioactivos) $\times 100$. Los resultados se expresaron como porcentaje de la dosis aplicada por 10^6 células o como cpm/1000 células para una comparación mejor.

Ejemplo 4

Evaluación de la tasa de supervivencia celular después del tratamiento con 3/4-yodo-L-fenilalanina. Después de desarrollar un césped confluyente de células, los cultivos se expusieron a $0,1\text{-}5 \mu\text{mol/ml}$ del fármaco correspondiente hasta 48 horas a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ al 5%. En un experimento paralelo, las células se irradiaron usando un acelerador lineal de 6 MeV con dosis desde 2 a 15 Gy o se trataron con IPA-131 para comparar la tasa de supervivencia celular. Para ser capaz de observar la morfología de las células de glioma, las células se hicieron crecer en portaobjetos estándar de vidrio o en placas de cultivo estándar. Después se eliminó el medio y las células se fijaron en etanol al 70% durante al menos 30 minutos en hielo para análisis de citometría de flujo después de la tinción o en formalina tamponada neutra al 4% para análisis inmunohistopatológicos.

Ejemplo 5

Modelos tumorales

Se llevó a cabo un experimento *in vivo* en un modelo de glioma humano intracraneal en ratas RNU para evaluar la eficacia terapéutica de 4-yodo-L-fenilalanina (IPA) en glioma.

Se implantaron células de glioblastoma humano primario A1207 y T3868 ($0,5 \times 10^6$ células) de forma estereotáxica en la región frontal derecha de ratas RNU (2 mm posterior y 2 mm lateral a la intersección de las suturas sagital y bregma a una profundidad de 5 mm) con anestesia de cloralhidrato. La craniectomía se reselló con cera ósea y el cuero cabelludo se cerró.

Se administró i.p. IPA (1 y 5 mg/kg de pc) en ratas que llevaban xenoinjertos de glioblastoma humano ($n = 9$ en cada grupo), empezando el día 1 después de la implantación estereotáxica.

Se administró IPA a diario en la primera semana después de la implantación y semanalmente después. Otras seis ratas RNU se trataron con solución salina y sirvieron como control.

Después se compararon los siguientes parámetros: tiempo mediano de supervivencia, tamaño del tumor e histología después de la biopsia.

Ejemplo 6

Exámenes morfológicos e histológicos

Se fijaron células tumorales humanas hechas crecer en portaobjetos estándar de vidrio en formalina tamponada neutra al 4% y se tiñeron con el método de Giemsa. Se calculó el número de células en 10 campos seguidos de gran aumento ($\times 40$).

En la autopsia de las ratas, además de los cerebros, se recogieron otros órganos incluyendo corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, piel y colon. Los cerebros se cortaron en secciones coronarias de alrededor de 2-3 mm de espesor. Todos los tejidos de los animales se fijaron en formalina tamponada neutra al 4% y se embebieron en cera parafínica. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina y Verhoeff-van Gieson y se examinaron histopatológicamente.

Ejemplo 7

Análisis estadístico

- 5 Se determinó la significancia estadística de diferencias entre grupos experimentales mediante la prueba t de Student. Se consideró significativo un valor de p menor de 0,05.

Ejemplo 8

10 *Resultados y discusión*

Estudios in vitro

- 15 Las figuras 1-3 muestran ejemplos de cinéticas de absorción de una IPA en células tumorales humanas. Se usó el derivado radiomarcado 4-¹²³I]yodo-L-fenilalanina para facilitar la cuantificación usando un contador gamma. Como se muestra, IPA muestra una absorción alta en células tumorales humanas con un aumento continuo durante el tiempo de investigación. Este resultado proporciona evidencia de la alta afinidad de los radiofármacos propuestos por tumores humanos, incluyendo los gliomas malignos, carcinomas de páncreas, cáncer de próstata y mama humanos.

- 20 El efecto citostático y el efecto radiosensibilizador de IPA en células de glioma se demuestran en las figuras 4-6. Como se muestra, el efecto citostático de IPA en células de glioblastoma humano primario es dependiente de la concentración y más pronunciado comparado con la irradiación externa hasta 15 Gy (Fig. 4). La combinación de IPA con irradiación externa produjo una drástica reducción de la tasa de supervivencia celular. Los análisis de citometría de flujo de células teñidas muestran inducción dependiente de la dosis de necrosis primaria y apoptosis, que fue más significativa que la causada por irradiación externa, incluso con 15 Gy, y más pronunciada al aumentar la concentración de IPA. Este resultado confirma el gran efecto radiosensibilizador de IPA en células de glioblastoma (Fig. 6). Las células supervivientes contenían sólo citoplasma escaso, los núcleos estaban contraídos y contenían cromatina aglutinada. Citológicamente, el modo de muerte celular era apoptosis ya que las células tumorales restantes contenían solamente citoplasma escaso y cuerpos apoptóticos, en otras células los núcleos estaban contraídos y contenían cromatina condensada.

Estudios in vivo

- 35 Cinco de seis ratas sin tratar con glioblastoma A1207 murieron de 12 a 22 días después de la implantación mientras que cuatro de seis ratas control con T3868 murieron en 28 días. El examen histológico de secciones finas de cerebro después de la biopsia confirmó tumores con características típicas de glioblastoma. En comparación, seis de nueve y siete de nueve ratas estaban aún vivas el día 28 mediante el tratamiento con IPA (1 y 5 mg/kg), respectivamente.

- 40 La figura 8 muestra un ejemplo de supervivencia de ratas sin tratar y tratadas con IPA con glioblastoma humano A1207 según el método de Kaplan-Meier, confirmando la eficacia de IPA en el tratamiento de gliomas.

Estos resultados sugieren un gran potencial terapéutico de 4-yodo-L-fenilalanina para tumores humanos, especialmente para gliomas malignos.

- 45 Los resultados demuestran que 3-yodo-L-fenilalanina y 4-yodo-L-fenilalanina representen una nueva clase de agentes terapéuticos para terapia tumoral en algunas entidades tumorales.

Referencias

- 50 1. Hortobagay G, *Cancer Control* 4; supl., 1997
2. O'Day S et al., *Cancer Control* 9: 31-38, 2002
- 55 3. Nieto Y et al. *Biology of blood and marrow transplantation* 11: 297-306, 2005
4. Carlson K et al. *Bone marrow transplantation* 35: 985-90, 2005
5. Gruenhagen D et al. *Annals of surgery* 240: 939-47, 2004
- 60 6. Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, de Vries EG, Langen KJ, Piers DA. Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med* 2001; 42: 432-445.
7. Laverman P, Boerman OC, Corstens FH, Oyen WJ. Fluorinated amino acids for tumour imaging with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29: 681-690.
- 65 8. Hellwig D, Ketter R, Romeike BF, Sell N, Schaefer A, Moringlane JR, Kirsch CM, Samnick S: Validation of brain tumour imaging with p-[¹²³I]iodo-L-phenylalanine and SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 1041-1049, 2005.

9. S. **Samnick**, D. **Hellwig**, B.F. **Romeike**, J.-R. **Moringlane**, W. **Feiden** y C.-M. **Kirsch**. Initial Evaluation on the feasibility of single photon emission tomography with L-p-[¹²³I]iodophenylalanine for routinely brain tumor imaging. *Nucl Med Commun* 23: 121-130, 2002.

10. **Fukushima K**, **Toyoshima S**. Antitumor activity of amino acid derivatives in the primary screening. *Gann*. 66 (1):29-36, 1975.

11. **Otani TT**, **Briley MR**. Structure-activity relationships among substituted N-benzoyl derivatives of phenylalanine and its analogues in a microbial antitumor prescreen III: derivatives of p-fluoro-DL-phenylalanine. *J Pharm Sci*. 74(1):40-43, 1985.

12. **Loeffler LJ**, **Sajadi Z**, **Hall IH**. Antineoplastic agents. 2. Structure-activity studies on N-protected vinyl, 1,2-dibromoethyl, and cyanomethyl esters of several amino acids. *J Med Chem* 20: 1584-1588, 1977.

13. **Otani TT**, **Briley MR**. m- And p-halobenzoyl derivatives of p-halo-DL-phenylalanine as inhibitors in a microbial antitumor prescreen. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 40(2): 325-8, 1983.

14. **Otani TT**, **Briley MR**. The study of structure-activity relationships among substituted N-benzoyl derivatives of phenylalanine and its analogs in a microbial antitumor prescreen: II. Derivatives of m-fluoro-DL-phenylalanine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 40: 321-324, 1983.

15. **Kelly CJ**, **Johnson TC**.: Effects of p-chlorophenylalanine and alphamethylphenylalanine on amino acid uptake and protein synthesis in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*. 1978 15;174(3):931-8.

16. **Prohaska JR**, **Wells WW**, **Luecke RW**.: Effect of phenylalanine and p-chlorophenylalanine administration on the development of rat brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1974; 147(2):566-71.

17. **Waders RL**, **Hofer KG**, **Harris CR**, **Smith JM**. Radionuclid toxicity in cultured mammalian cells: Elucidation of the primary site of radiation damage. *Curr Top Radiat Res Quar* 12: 389-407, 1977.

18. **Zalutsky MR**, **Bigner DD**: Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunoconjugates. *Acta Oncol* 35: 373-379, 1996.

19. **Hofer KG**, **Keough G**, **Smith JM**. Biological toxicity of Auger emitters: molecular fragmentation versus electron irradiation. *Curr Top Radiat Res Quar* 12: 335-354, 1977.

20. **Behr TM**, **Wormann B**, **Gramatzki M**, **Riggert J**, **Gratz S**, **Behe M**, **Griesinger F**, **Sharkey RM**, **Kolb HJ**, **Hiddemann W**, **Goldenberg DM**, **Becker W**: Low- versus high-dose radioimmunotherapy with humanized anti-CD22 or chimeric anti-CD20 antibodies in a broad spectrum of B cell-associated malignancies. *Clin Cancer Res* 5: 3304-3314, 1999.

REIVINDICACIONES

1. Uso de 3-yodo-L-fenilalanina y 4-yodo-L-fenilalanina para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una neoplasia maligna.
2. El uso según la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica comprende además un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, una vacuna, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip y/o un agente endorradioterapéutico.
3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde la composición farmacéutica se va a administrar a un paciente que posteriormente se irradiará por vía percutánea.
4. Una 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina para uso en el tratamiento de una neoplasia maligna.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 4, en donde la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se va a administrar al sujeto en dosis de 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 5 ó la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 4 ó 5, en donde la fenilalanina halogenada es 4-yodo-L-fenilalanina.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 5 ó 6 ó la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la neoplasia maligna se selecciona de un grupo que consiste en glioma maligno, mieloma múltiple, melanoma maligno, cáncer de próstata y mama.
8. El uso o la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 7, en donde el glioma se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, astrocitoma, oligastrocitoma y ependimoma.
9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 5 a 8 o la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina tiene sobre las células malignas o tejido de la neoplasia un efecto radiosensibilizador, un efecto citostático y/o un efecto de revertir un estado adquirido o constitutivo de resistencia celular a quimioterapia o radioterapia.
10. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se va a administrar por vía intravenosa u oral.
11. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en donde la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina se va a administrar en una dosis única de una vez, como dosis fraccionadas en dosis de 2 a 60 fracciones o como dosis continua que se da diariamente hasta que la enfermedad progresa de nuevo o hasta la muerte del sujeto.
12. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde el sujeto se va a tratar además mediante una terapia concomitante seleccionada del grupo que consiste en una terapia quirúrgica, una quimioterapia, una endo- o exorradioterapia, una inmunoterapia, una terapia génica, una terapia de vacuna, una terapia de nucleótido antisentido, una terapia de ARNip, una terapia intracavitaria o un tratamiento basado en dispositivo.
13. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 12, en donde la terapia concomitante es una exorradioterapia en donde el sujeto se irradia por vía percutánea posteriormente a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina.
14. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 13, en donde la irradiación se va a realizar de 0 a 7 días posterior a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina.
15. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 14, en donde la irradiación se va a realizar en una irradiación externa acumulada de un paciente en una dosis de 1 a 100 Gy.
16. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 12, en donde la terapia concomitante comprende la administración de un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip, una vacuna y/o un agente endorradioterapéutico o la implantación de un dispositivo radioactivo.
17. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 16, en donde la administración de un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, un agente de terapia génica, un agente terapéutico nucleótido antisentido, un agente terapéutico ARNip, una vacuna y/o un agente endorradioterapéutico se va a realizar antes de, de forma simultánea y/o posterior a la administración de la 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina.

ES 2 341 575 T3

18. La 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina según la reivindicación 4, en donde el sujeto es un sujeto humano.

19. Una composición farmacéutica que comprende 3-yodo-L-fenilalanina o 4-yodo-L-fenilalanina, en donde el
5 yodo es el isótopo estable no radioactivo [^{127}I]-yodo.

20. La composición farmacéutica según la reivindicación 19, que comprende además formulaciones adecuadas de vehículo, estabilizantes y/o excipientes.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

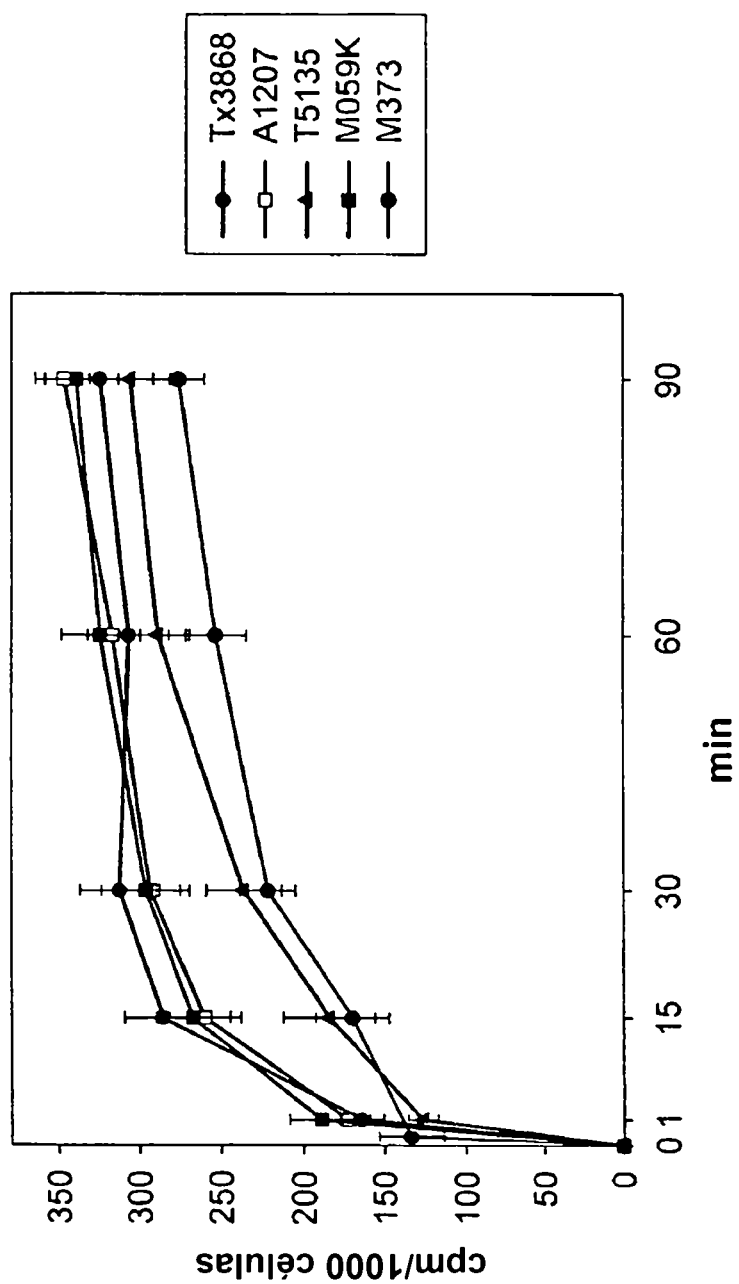


Figura 1

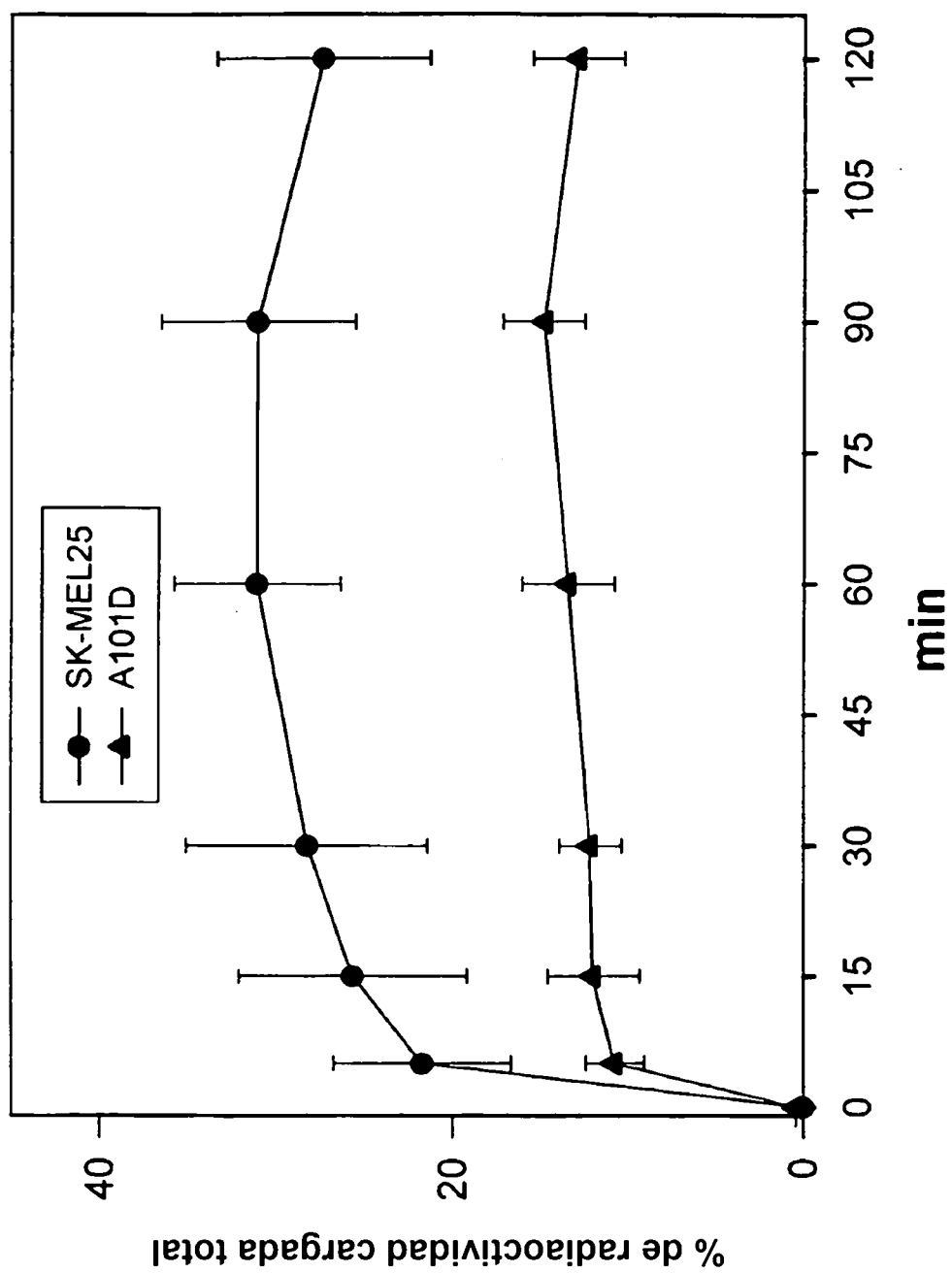


Figura 2

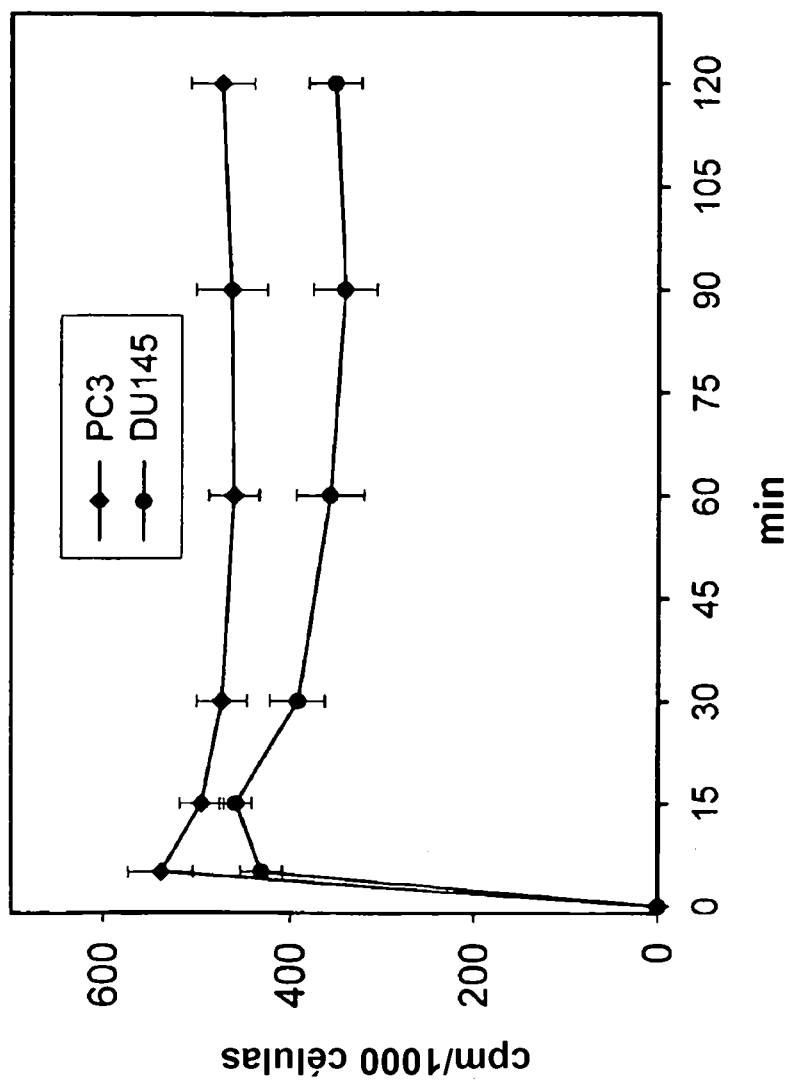


Figura 3

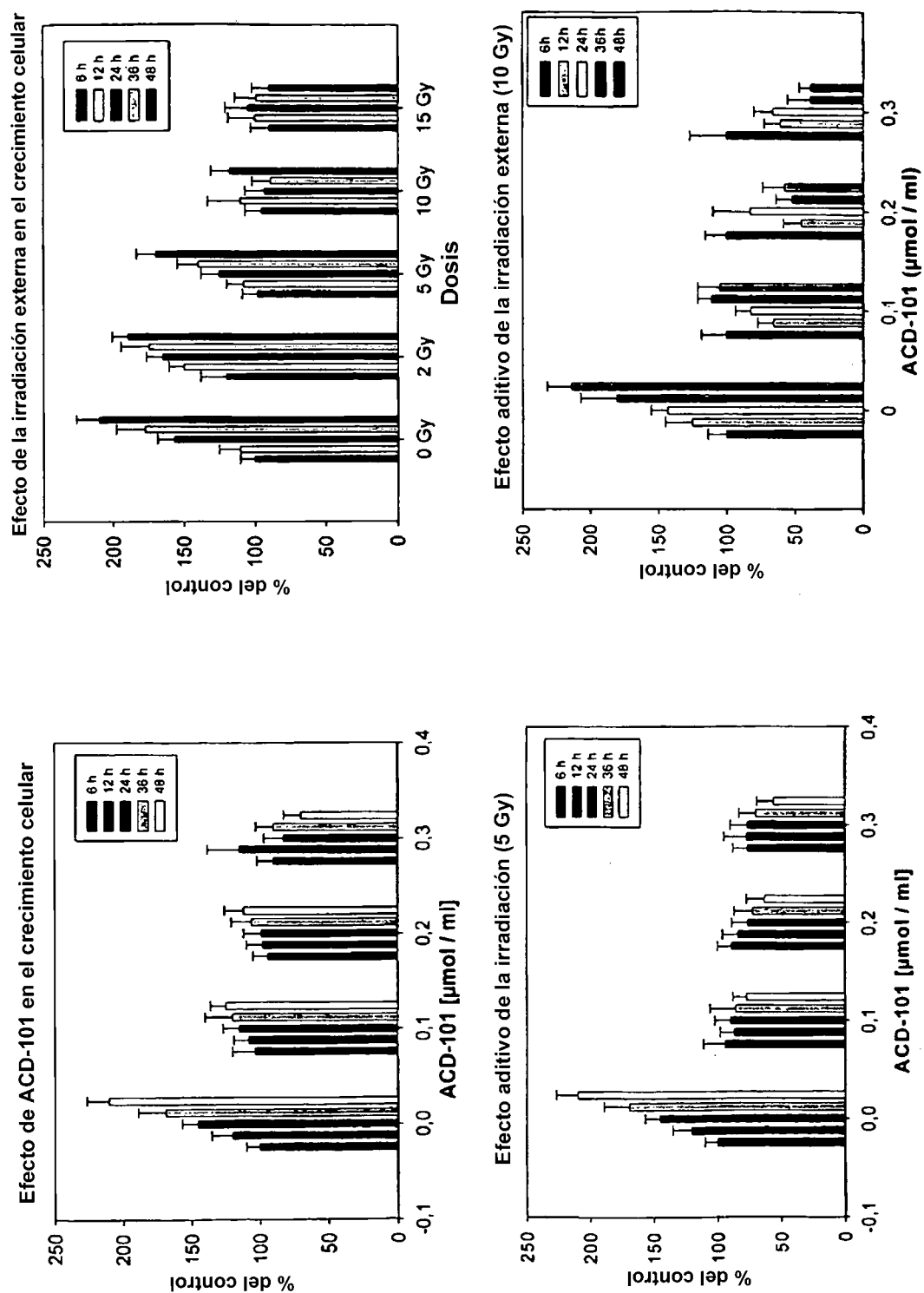


Figura 4

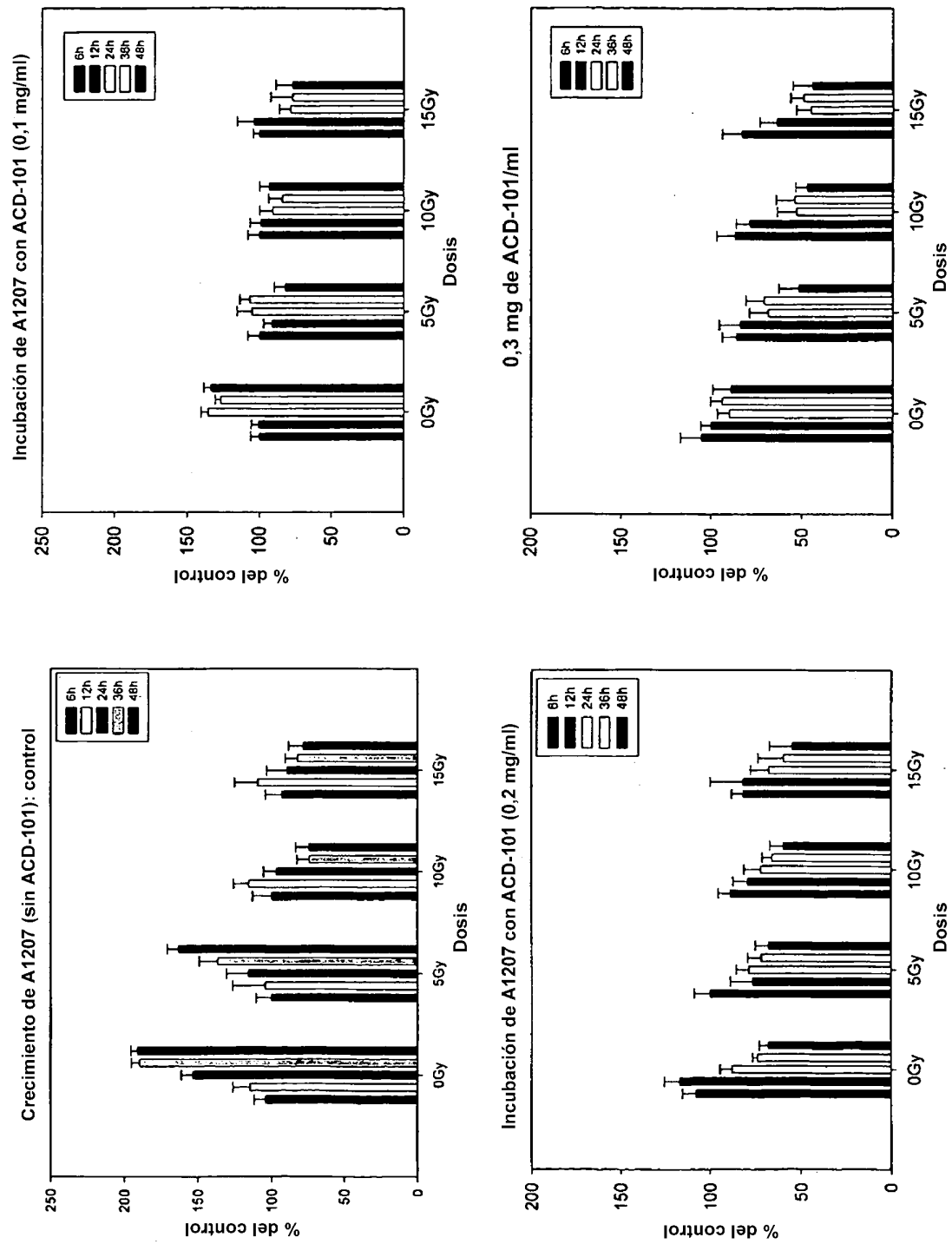


Figura 5

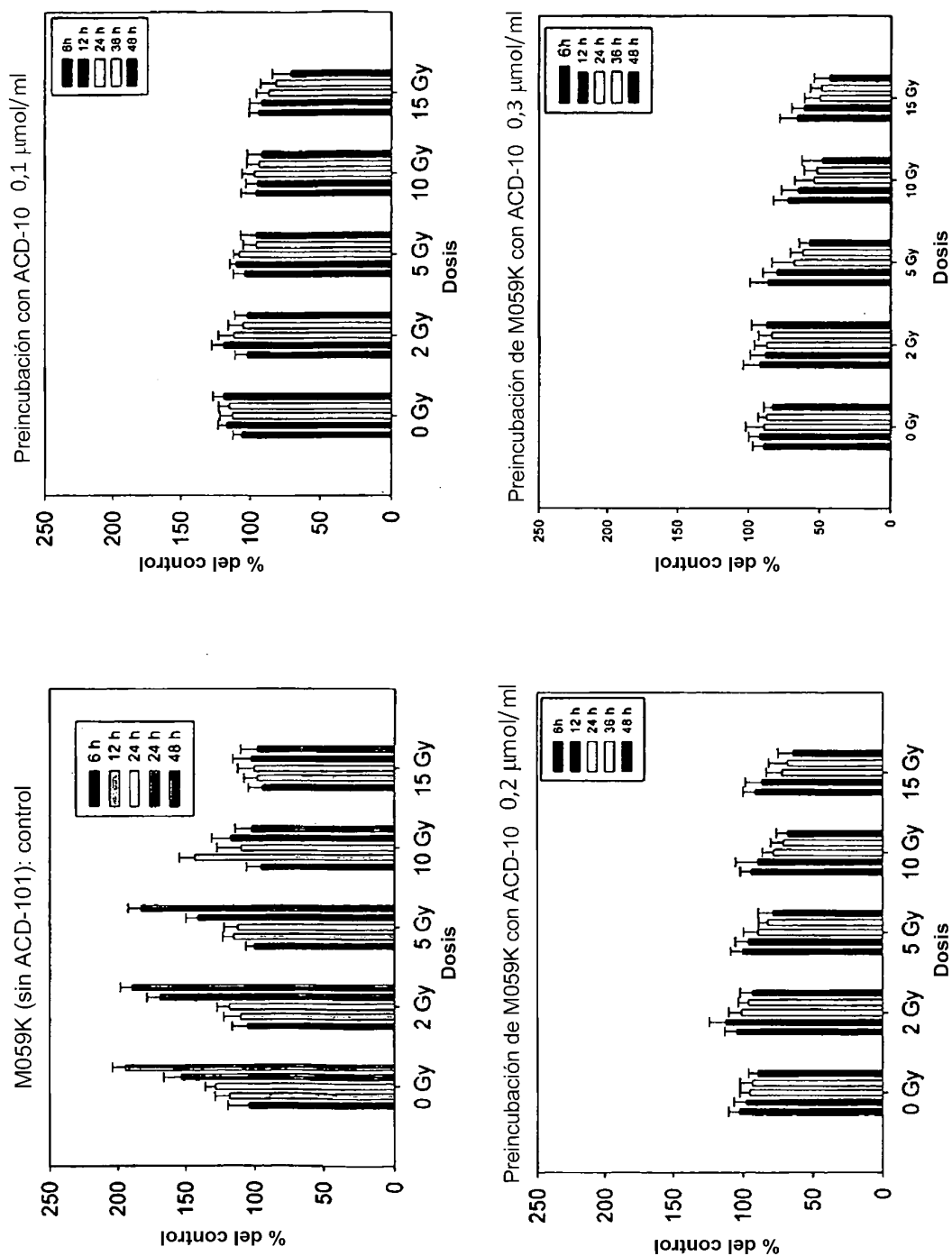


Figura 6

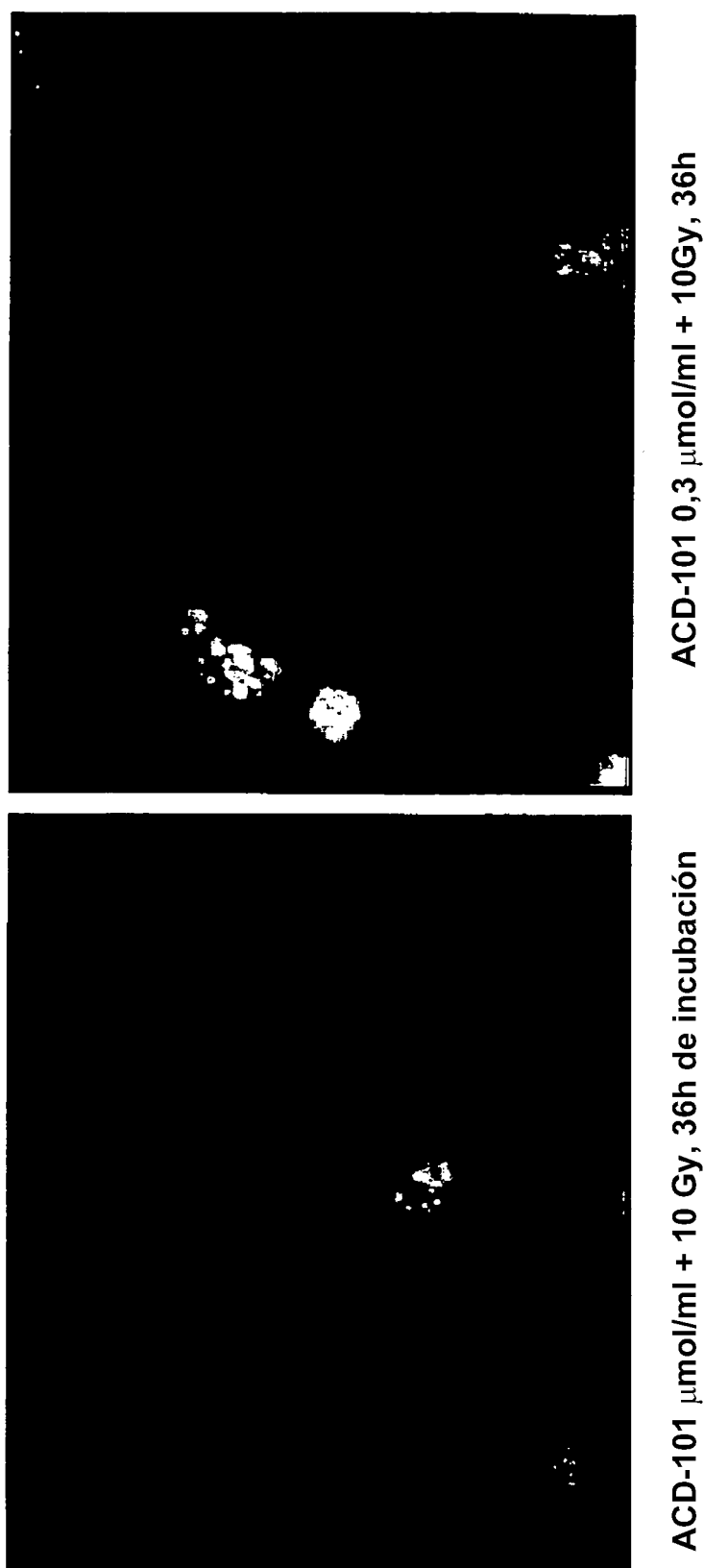


Figura 7

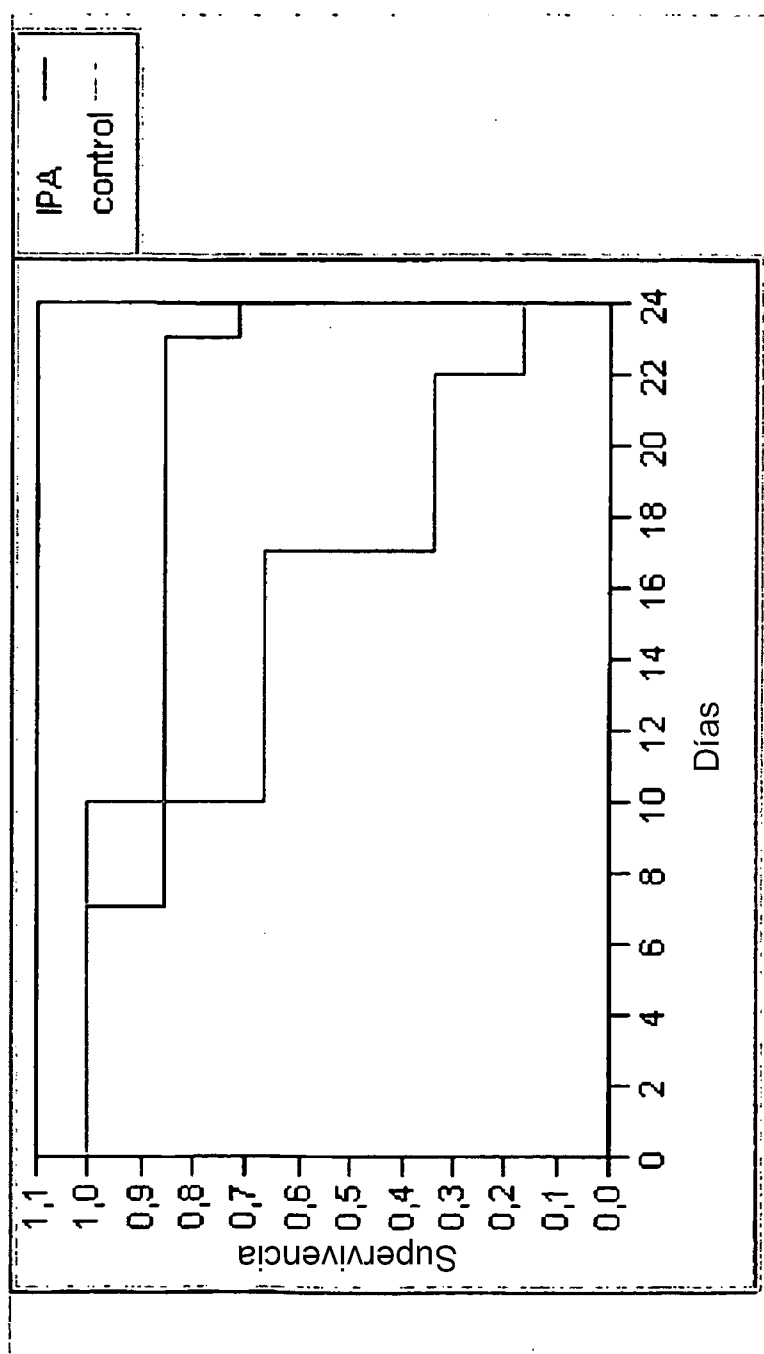


Figura 8