



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 655**

51 Int. Cl.:
A61K 51/10 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **99967161 .3**
86 Fecha de presentación : **30.11.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1135170**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2001**

54 Título: **Radioconjugación de anticuerpos de internalización.**

30 Prioridad: **01.12.1998 US 203676**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **Duke University**
230 North Building, Research Drive, Box 90083
Durham, North Carolina 27708-0083, US

72 Inventor/es: **Zalutsky, Michael, R.**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

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

Radiokonjugación de anticuerpos de internalización.

5 Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere al área de la tecnología de la radiokonjugación. En particular, se refiere a la utilización de anticuerpos de internalización en radioinmunoterapia.

10 Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son vehículos atractivos para dirigir la radiación a tumores debido a su capacidad de reaccionar específicamente con determinantes moleculares en células cancerígenas. Sin embargo, el impacto anticipado de mAbs marcados en el tratamiento clínico del cáncer aún no se ha alcanzado; la pérdida de la marca del mAb *in vivo* y la captación de radioactividad en tejidos normales han dificultado su aplicación clínica. El yodo-131 es el nucleído utilizado más frecuentemente en la radioinmunoterapia clínica, pero su utilidad está comprometida por la deshalogenación *in vivo* de mAbs marcados mediante procedimientos convencionales.

Los mAbs radiomarcados podrían jugar un papel importante en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer si la especificidad molecular inherente en la interacción mAb-antígeno se puede explotar de manera satisfactoria para liberar selectivamente radionucleídos a tumores. Para muchos tipos de cáncer, la radioinmunoterapia es una alternativa atractiva a la terapia de radiación con rayos externos y quimioterapia administrada sistémicamente, tratamientos que son frecuentemente inefectivos a causa de las toxicidades limitantes de la dosis para tejidos normales. La radioinmunoescintilografía es atractiva no sólo para la detección de la lesión, sino también como medio para determinar qué pacientes son candidatos adecuados para la terapia de mAb con marcado. Numerosos estudios clínicos han confirmado la capacidad de los mAbs marcados para localizarse tanto en cánceres primarios como metastáticos (revisión en Britton y Granowska, 1996; Larson, 1995), y en pacientes con tumores radiosensibles, se han obtenido respuestas terapéuticas significativas con mAbs marcados con ¹³¹I (Press y otros, 1995; Kaminski y otros, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que otros tumores son menos radiosensibles, presumiblemente debido al bajo nivel de radionucleído retenido en el tumor y la acumulación significativa de radioactividad en órganos normales (Kairemo, 1996; Bast y otros, 1997). Existe la necesidad en la técnica de técnicas y reactivos mejorados para dirigir selectivamente radiomarcadores terapéuticos y de diagnóstico a células tumorales.

Características de la invención

Un objetivo de la presente invención es dar a conocer ligandos radioconjugados y métodos para su utilización en la localización y tratamiento de tumores. Estos y otros objetivos de la presente invención se disponen mediante una o más de las realizaciones descritas a continuación.

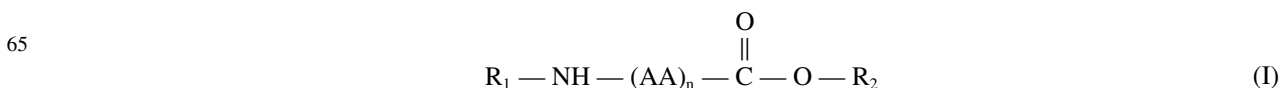
Una realización de la presente invención da a conocer una composición para marcar internamente una célula. La composición comprende un ligando, un oligopéptido, y un marcador. El ligando es cualquier fracción que se une específicamente a un antígeno o receptor de la superficie celular y es internalizado por la célula. El ligando se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, y un polipéptido sintético. El oligopéptido comprende, como mínimo, un residuo de aminoácido cargado positivamente y, como mínimo, un residuo de D-aminoácido. El oligopéptido no comprende dos o más residuos de L-aminoácidos contiguos. El oligopéptido está unido covalentemente al ligando. El marcador está unido covalentemente al oligopéptido.

Otra realización de la presente invención da a conocer un método para incorporar un marcador a una célula. El método comprende la etapa de poner en contacto la célula con la composición descrita en el párrafo anterior, a través de lo cual el marcador es internalizado por la célula.

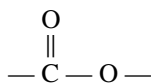
Otra realización adicional de la presente invención da a conocer un método para localizar células tumorales en un mamífero. El método comprende las etapas de introducir una cantidad diagnósticamente efectiva de la composición anterior en el cuerpo de un mamífero que comprende células tumorales, escanear el cuerpo con un detector de escintilación, y generar una imagen que representa las células tumorales en el cuerpo de un mamífero.

Otra realización adicional de la presente invención da a conocer la utilización de la composición anterior en radio-terapia, que comprende la etapa de introducir una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición anterior en el cuerpo de un mamífero que comprende un tumor, a través de lo cual se reduce el crecimiento del tumor.

Una realización adicional de la presente invención da a conocer un compuesto para marcar un ligando que se une a un antígeno de la superficie celular. El compuesto comprende una molécula de fórmula (I):



El grupo -NH- representa el extremo amino y el grupo



representa el extremo carboxilo de la molécula. AA representa una aminoácido y n es un número entero que tiene un valor mínimo de 1, y como máximo, aproximadamente, 10, 15 ó 20. R₁ es H o un grupo protector de amino y R₂ es H o un grupo protector de carboxilo, con la condición de que R₁ = R₂ = H es una condición poco apropiada para esta molécula. O bien R₁ o bien R₂ es H. Como mínimo, un residuo de aminoácido está positivamente cargado y, como mínimo, un residuo de aminoácido es D-aminoácido. La molécula no comprende dos o más L-aminoácidos contiguos. Como mínimo, un aminoácido es suficiente para acoplarse a un marcador. La molécula es suficiente para acoplarse a un ligando en uno de su extremo amino o su extremo carboxilo.

La presente invención da a conocer así en la técnica herramientas novedosas para introducir ligandos marcados en una célula.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B ilustran la forma en la que se conforman las dos composiciones preferentes de la presente invención. En la figura 1A, el oligopéptido de la izquierda (D-Lys-D-Arg-D-Arg-D-Arg, SEC ID No: 1) se acopla en la primera reacción a través del grupo ε-amino de D-Lys a una fracción química (por ejemplo, 5-yodo-3-piridin-carboxilato) que comprende un marcador (por ejemplo, ¹³¹I). En la segunda reacción, el terminal carboxilo libre del oligopéptido marcado se acopla a un grupo amino libre en un anticuerpo monoclonal. En la figura 1B, se llevan a cabo dos reacciones similares, pero el oligopéptido es D-Tyr-D-Arg-D-Arg-D-Arg (SEC ID No: 2); y el marcador (por ejemplo, ¹³¹I) se acopla directamente a D-Tyr.

Las figuras 2A y 2B muestran la actividad intracelular y del sobrenadante del cultivo celular, respectivamente, tras la incubación de mAb L8A4 marcado utilizando SIPC (barras coloreadas) y SIB (barras en blanco) con células HC2 20 d2 positivas de EGFRvIII.

La figura 3 representa la unión y la internalización de L84A murino marcado a la línea celular U87MGΔEGFR, que expresa el receptor EGFRvIII mutante. El anticuerpo marcado se preparó mediante marcaje directo de Yodógeno utilizando ¹³¹I o utilizando un oligopéptido (α-N-Ao-D-Lys-D-Arg-D-Tyr-D-Arg-D-Arg, SEC ID No: 3) que se habían marcado de Yodógeno con ¹²⁵I en su residuo de D-Tyr y acoplado al anticuerpo, tal como se describe en el Ejemplo 8.

La figura 4 muestra el transcurso con el tiempo de la captación en el tumor de radioyodo, expresado como el porcentaje de la dosis inicial por gramo de tumor. L8A4 murino se marcó con ¹²⁵I utilizando el método del oligopéptido y con ¹³¹I utilizando el marcaje directo con Yodógeno. El experimento se realizó en ratones atímicos que llevaban xenoinjertos subcutáneos de glioma humano U87MGΔEGFR que expresa EGFRvIII.

La figura 5 muestra el nivel de acumulación en la tiroides de radioyodo en condiciones del experimento representado en la figura 3. La acumulación en la tiroides es un indicador de la deshalogenación de compuestos radioyodados *in vitro*.

La figura 6 presenta la proporción de la captación de radioyodo en el tumor con respecto a sangre en las condiciones del experimento representado en la figura 3.

Descripción detallada de la invención

Es un descubrimiento de la presente invención que la conjugación de radiomarcadores a ligandos que se unen a antígenos de la superficie celular a través de oligopéptidos resistentes a la proteólisis, cargados positivamente, mejore la eficacia de la radioinmunoterapia. La localización selectiva y retención del radiomarcador en una clase de células diana se incrementa utilizando dichos oligopéptidos.

Un marcador está unido covalentemente a un oligopéptido que comprende, como mínimo, un residuo de D-aminoácido y, como mínimo, un residuo de aminoácido cargado positivamente. El marcador puede estar unido covalentemente directamente al oligopéptido, o puede estar unida covalentemente a un grupo químico, que a su vez está unido covalentemente al oligopéptido. El oligopéptido está unido covalentemente al ligando.

Un ligando, según se aplica el término en la presente invención, es cualquier molécula que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular. Un antígeno de la superficie celular es cualquier antígeno o receptor de la superficie celular que está internalizado por la célula. Los ligandos se pueden internalizar por las células durante segundos, minutos, horas o días. Los ligandos preferentes de la presente invención se internalizan rápidamente, es decir, la mayoría del ligando se internaliza después de minutos a horas. Se considera que un ligando se une específicamente cuando se une con una constante de afinidad de 10⁶ M⁻¹ o más, preferentemente 10⁸ M⁻¹ o más. Si el antígeno de la superficie celular es un receptor, entonces el receptor se puede internalizar con o sin un ligando unido. Un ejemplo

de un receptor de internalización es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que es un antígeno de la superficie celular que se internaliza mediante el proceso de endocitosis mediada por el receptor. Los antígenos o receptores que son internalizados por la célula se pueden localizar finalmente dentro de endosomas o lisosomas.

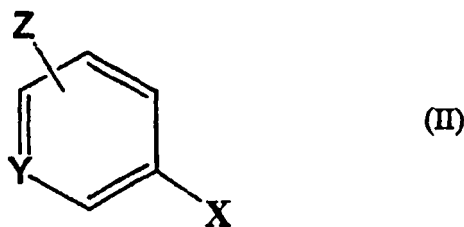
5 Un ligando puede ser un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, o un péptido sintético que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular. En una realización preferente, el ligando es un anticuerpo de internalización. Cualquier anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular y está internalizado por la célula es un anticuerpo de internalización. El anticuerpo puede ser una inmunoglobulina de cualquier clase, es decir, IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, y se puede obtener por inmunización de un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, 10 cabra, oveja, primate, humano u otra especie adecuada. El anticuerpo puede ser policlonal, es decir, obtenido del suero (también denominado antisuero) o un animal inmunizado con un antígeno de la superficie celular o un fragmento del mismo. El anticuerpo también puede ser monoclonal, es decir, formado mediante inmunización de un mamífero que utiliza el ligando o antígeno de la superficie celular o un fragmento de los mismos, la fusión de células de linfa o bazo del mamífero inmunizado con una línea de células de mieloma, y aislamiento de clones de hibridomas específicos, 15 tal como se conoce en la técnica. Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales de internalización que son adecuados para su utilización de la presente invención se incluyen L8A4, Y10 y H10 (Reist y otros, 1995). El anticuerpo también puede ser un anticuerpo recombinante, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o de interespecie producido mediante métodos de ADN recombinantes. Un anticuerpo de internalización preferente es un anticuerpo humanizado que comprende regiones constantes de inmunoglobulina humana junto con regiones variables murinas que poseen especificidad para la unión a un antígeno de superficie celular (ver, por ejemplo, Reist y otros, 1997). Si se utiliza un fragmento de un anticuerpo, el fragmento debería ser capaz de unirse específicamente a un antígeno de la superficie celular. El fragmento puede comprender, por ejemplo, como mínimo, una parte de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina y, como mínimo, una parte de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina. Un ligando también puede ser un polipéptido sintético que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular. 20 Por ejemplo, el ligando puede ser un polipéptido sintético que comprende, como mínimo, una parte de una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina y, como mínimo, una parte de una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina, tal como se describe en la Patente de U.S.A. 5.260.203 o en cualquier otro documento conocido en la técnica.

30 El oligopéptido comprende, como mínimo, un aminoácido cargado positivamente y, como mínimo, un D-aminoácido. El aminoácido cargado positivamente puede ser un D- o un L-aminoácido. Los aminoácidos cargados positivamente utilizados en el oligopéptido son aquellos que transportan una carga neta positiva en su cadena lateral al pH del medio extracelular (aproximadamente 7,4) o al pH del medio intracelular (aproximadamente 6,8-7,2) o preferentemente al pH de los contenidos lumenales de los endosomas (aproximadamente 5-6) o lisosomas (aproximadamente 5). 35 Entre los ejemplos de dichos aminoácidos cargados positivamente se incluyen la histidina, más preferentemente lisina, y más preferentemente arginina. Se prefieren los aminoácidos que tienen la configuración de D-estereoisómero para la utilización en el oligopéptido, aunque también se pueden utilizar aminoácidos que tienen configuración L. Los D-aminoácidos hacen que el oligopéptido sea más resistente a proteasas lisosomales (Ehrenreich y Cohn y otros, 1969), mejorando así la retención del marcador en las células diana y limitando la liberación del marcador, y su posterior recaptación por otras células. El oligopéptido no contiene dos o más L-aminoácidos contiguos. En una realización preferente, si el oligopéptido comprende dos o más L-aminoácidos, los L-aminoácidos están separados entre sí por uno o más aminoácidos cargados positivamente. En otra realización preferente, el oligopéptido comprende, como mínimo, un residuo de D-Tyr. En aún otra realización preferente, el oligopéptido comprende, como mínimo, un residuo de D-Lys. 40

45 Se puede utilizar cualquier marcador que permita detectar o afectar por el marcador las células que captan la composición. Por ejemplo, para permitir la detección de un grupo de células diana, el marcador puede ser fluorescente o radioactivo. También se puede utilizar un marcador o etiqueta fluorescente cuando las células diana específicas se detectarán fuera del cuerpo, es decir, *ex vivo*. Se puede utilizar cualquier molécula fluorescente que sea adecuada para la detección mediante métodos estándar, incluyendo, por ejemplo, espectroscopia de fluorescencia y microscopia por fluorescencia. Se puede utilizar un marcador o etiqueta radioactiva cuando las células se detectarán en el interior o en el exterior del cuerpo, es decir, *in vivo* o *ex vivo*. La detección se puede realizar mediante métodos radiológicos estándar, incluyendo, por ejemplo, el escaneo del cuerpo con un detector de escintilación (radioescintilografía) y tomografía por emisión de positrones (PET) (ver, por ejemplo, Bradwell y otros, 1985). Para una utilización *in vivo*, el 50 marcador debería ser un marcador farmacológicamente aceptable y debería administrarse en cantidades diagnóstica o terapéuticamente aceptables. Una cantidad terapéuticamente aceptable es una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis, produce el efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la disminución de un tumor, con un nivel de toxicidad aceptable para el tratamiento clínico. Tanto la dosis de una composición particular como los medios de administración de la composición se pueden determinar en base a cualidades específicas de la composición, la condición, edad, y el peso del paciente, la progresión de la enfermedad particular en tratamiento, y otros factores relevantes. Si la composición contiene anticuerpos, las dosis eficaces de la composición están en el intervalo de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente, de aproximadamente 50 μg a aproximadamente 5 mg/kg , de aproximadamente 100 μg a aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal del paciente, y de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Una cantidad diagnósticamente aceptable es una cantidad que permite la detección del 65 marcador según se requiera para la diagnosis, con un nivel de toxicidad aceptable para la diagnosis. Los radiomarcadores que se pretenden utilizar para el objetivo de detectar células diana emitirían preferentemente radiación que es detectable por fuera del cuerpo, por ejemplo, radiación gamma, cuando se administra en cantidades diagnósticamente aceptables. Entre dichos radiomarcadores se incluyen, pero no se limitan a, los radionucleidos ^{18}F , ^{76}Br , ^{75}Br , ^{123}I , ^{124}I ,

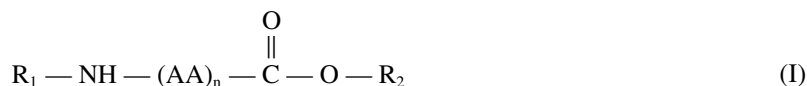
^{125}I , y ^{131}I . Los radiomarcadores que se pretenden utilizar para disminuir el crecimiento de un tumor deberían emitir preferentemente radiación que se absorbe en la célula tumoral para dañar la célula, por ejemplo, mediante la interrupción del ADN de la célula. Dichos radiomarcadores deberían provocar preferentemente un daño mínimo a las células sanas adyacentes. Los radiomarcadores que interrumpen en la célula pueden emitir, por ejemplo, radiación alfa, beta, y/o gamma. Entre dichos radiomarcadores se incluyen, pero no se limitan a, los radionucleidos ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I y ^{211}At . Los radiomarcadores se pueden unir covalentemente al oligopéptido mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo la yodación de un residuo de tirosina (ver, por ejemplo, Fraker y Speck, 1978), la yododestanolación (Zalutsky y Narula, 1987) y astatodestanolación (ver Ejemplo I y Foulon y otros, 1998).

El marcador puede ser un grupo químico que se une covalentemente al oligopéptido. El grupo químico tiene la estructura de la fórmula (II). Para el grupo químico en la fórmula (II), X puede ser un grupo amino, un grupo carboxilo, o $(\text{CH}_2)_n\text{SH}$, en la que n es un número entero de 0 a 10. Y puede ser C ó N, y Z puede ser F, Br, I, At ó $\text{M}(\text{Alk})_3$, en la que M puede ser Si, Sn ó Hg, y en la que Alk es un grupo alquilo, tal como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, o hexilo. El grupo químico puede ser un compuesto de ácido carboxílico unido a un grupo amino en el oligopéptido. Alternativamente, el grupo químico puede ser un compuesto amino unido a un grupo carboxilo en el oligopéptido. Los compuestos de ácido carboxílico preferentes son, por ejemplo, 5-yodo-3-piridincarboxilato, 3-yodobenzoato, 3-(tri-n-butilestanil)benzoato, 5-(tri-n-butilestanil)-3-piridincarboxilato, o 5-astato-3-piridincarboxilato. Los compuestos de piridincarboxilato son preferentes porque están positivamente cargados a pH lisosomal. La D-Lys se prefiere como un aminoácido para el oligopéptido en esta composición, ya que el compuesto de ácido carboxílico se puede unir a través del grupo ϵ -amino de Lys. Se puede incorporar un radionucleido, por ejemplo, ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I y ^{211}At al compuesto de ácido carboxílico utilizando métodos disponibles en la técnica. Ver Zalutsky y Narula (1987).

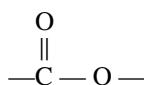


Las composiciones según la presente invención se pueden utilizar para marcar internamente una célula. Un marcador se puede incorporar a una célula o un grupo de células mediante el contacto de la célula con una composición de la presente invención. Tal como se describe en los párrafos anteriores, una composición de la presente invención comprende un ligando que está unido covalentemente a un oligopéptido, que, a su vez, está unido covalentemente a un marcador. La célula se pone en contacto con la composición descrita anteriormente, de manera que el marcador se internaliza en la célula. La célula se puede localizar en el interior del cuerpo de un humano o un animal, o se puede aislar del cuerpo y contacta con la composición *ex vivo*. La composición se puede poner en contacto con la célula mediante cualquier medio compatible con los requisitos terapéuticos o diagnósticos del método. Por ejemplo, la composición se puede inyectar o infundir en un paciente o animal mediante una ruta intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Para una aplicación *in vitro* del método, la composición se puede añadir al medio que baña la célula. Tras la internalización del marcador, las células marcadas se pueden detectar utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente. El contacto de una célula con la composición significa contactar la célula tan frecuentemente o tanto tiempo como se requiera para el objetivo de análisis, diagnóstico o terapia. Por ejemplo, la célula se puede poner en contacto con la composición en intervalo de minutos, horas, días, semanas, meses o años.

Los compuestos adecuados para acoplarse a un ligando que se une específicamente a un antígeno de la superficie celular puede comprender una molécula de fórmula (I):



El grupo -NH- representa el extremo amino y el grupo



representa el extremo carboxilo de la molécula. AA representa un aminoácido y n es un número entero que tiene un valor mínimo de 1. R_1 es H o un grupo protector de amino y R_2 es H o un grupo protector de carboxilo, con la condición de que $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$ es una condición poco apropiada para esta molécula. O bien R_1 o bien R_2 es H. Como mínimo, un residuo de aminoácido es un D-aminoácido y, como mínimo, un residuo de aminoácido está positivamente cargado a pH lisosomal. La molécula no comprende dos o más L-aminoácidos contiguos. En una realización preferente, si se

utilizan dos o más L-aminoácidos, están separados entre sí por uno o más aminoácidos cargados positivamente. La estructura es suficiente para acoplarse a un ligando en sólo uno de su extremo amino o su extremo carboxilo.

Los compuestos se pueden marcar de varias maneras. En primer lugar, un aminoácido en el oligopéptido, por ejemplo, tirosina, se puede yodar directamente. En segundo lugar, un grupo químico de fórmula II se puede acoplar a un grupo amino o carboxilo libre en un residuo de aminoácido del oligopéptido, por ejemplo, al grupo ϵ -amino de D-Lys. En tercer lugar, un grupo químico de fórmula II se puede acoplar al extremo amino o carboxilo libre del compuesto de fórmula I. Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para el marcaje. El marcador puede ser cualquier cualquiera de los marcadores descritos anteriormente. Por ejemplo, el marcador puede ser un radionucleído seleccionado del grupo, ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I y ^{211}At , o el marcador puede ser un marcador fluorescente. El marcador se puede añadir antes o después del acoplamiento del grupo químico de fórmula (II) al oligopéptido, o antes o después del acoplamiento del oligopéptido al ligando.

Los compuestos se pueden acoplar con un ligando en su extremo amino o extremo carboxilo. A efectos de estar tan acoplado, en primer lugar, deben protegerse en cualquier extremo, que no reaccionará con el ligando. Los grupos amino o carboxilo libres se pueden proteger con cualquier grupo protector adecuado. Los grupos amino se pueden proteger mediante la conversión a una amida (ver, por ejemplo, J. March, 1977, en la página 383); el grupo protector correspondiente sería entonces, por ejemplo, un grupo alquilcarbonilo, arilcarbonilo, o aralquilcarbonilo. Los grupos carboxilo se pueden proteger mediante la conversión a un éster (ver, por ejemplo, J. March, 1977, en la página 431); el grupo protector correspondiente sería entonces, por ejemplo, un grupo alquilo, arilo, aralquilo o alquenilo. Los grupos bloqueadores se pueden añadir o eliminar mediante métodos estándar en la técnica.

mAbs de internalización

Muchas de los objetivos moleculares conocidos para mAbs marcados son antígenos y receptores que se internalizan. El linfoma de células B (Press y otros, 1994; Hansen y otros, 1996), leucemia de células T (Geissler y otros, 1991) y células de neuroblastoma (Novak-Hofer y otros, 1994) poseen todos antígenos que se internalizan rápidamente. Las pruebas de inmunoterapia clínica con mAbs específicos para estos antígenos están en proceso. Los receptores de internalización se han utilizado para dirigir los mAbs a los tumores. Entre estos se incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo salvaje (EGFR; gliomas y carcinoma de células escamosas; Brady y otros, 1992; Baselga y otros, 1994), el producto del oncógeno p185 *c-erbB-2* (carcinomas de mama y ovario; De Santes y otros, 1992; Xu y otros, 1997), y el receptor de transferrina (gliomas y otros tumores; Laske y otros, 1997). De hecho, se ha sugerido que la internalización tiene lugar con prácticamente cualquier mAb que se une a un antígeno de la superficie celular (Mattes y otros, 1994; Sharkey y otros, 1997a).

Una ventaja de la internalización de mAb para la radioinmunoterapia es el potencial para incrementar la dosis absorbida de radiación suministrada al núcleo de la célula. Los cálculos de la dosimetría sugieren que incluso con ^{131}I emisor β en el rango multicelular, que desplaza el sitio de descomposición desde la membrana celular a las vesículas citoplasmáticas, podría aumentar la dosis recibida por el núcleo celular en un factor de dos (Daghighian y otros, 1996). Por otro lado, un inconveniente de la internalización de mAb es que este hecho expone el mAb a procesos catabólicos adicionales que pueden dar lugar a la liberación de radioactividad de la célula tumoral.

EGFRvIII - Un objetivo específico del tumor

La sobreexpresión del receptor de EGFR de tipo salvaje tiene lugar en una variedad de cánceres. Sin embargo, EGFR está también presente en muchos tejidos normales, eliminando la ventaja de marcar el tumor. Además de provocar la sobreexpresión, la transformación oncogénica también puede conducir a la redistribución de genes de EGFR, incluyendo algunos que se caracterizan por las mutaciones de delección en el dominio extracelular del receptor (Wong y otros, 1992). Uno de éstos, EGFRvIII, tiene una delección en el marco de 801 pares de bases, dando lugar a la eliminación de los aminoácidos NH_2 terminal 6 a 273 y la generación de un residuo de glicina novedoso en el punto de fusión. Esto produce un receptor mutante 145 kDa, en comparación con 170 kDa para EGFR de tipo salvaje (Humphrey y otros, 1990). La expresión de EGFRvIII se ha observado en la mayoría de gliomas, meduloblastomas, carcinomas de mama y ovario, así como en el 16% de carcinomas de pulmón de células pequeñas (García de Palazzo y otros, 1993; Moscatello y otros, 1995; Wikstrand y otros, 1995). El EGFRvIII no se ha encontrado en tejidos normales, incluyendo aquellos que expresan el EGFR de tipo salvaje. Dado que el EGFRvIII sólo se expresa en células que experimentan una transformación maligna, esta molécula parece ser realmente específica de tumor y, de este modo, de gran valor para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. La citometría de flujo cuantitativa de biopsias de pacientes de glioma ha revelado un promedio de 3×10^5 a 7×10^5 receptores EGFRvIII por célula (Wikstrand y otros, 1997), un nivel que debería ser más que suficiente para marcar tumores. Los anticuerpos que son específicos para EGFRvIII se desarrollaron utilizando un péptido de 14-mer que corresponde a la unión de fusión como inmunógeno (Humphrey y otros, 1990; Wikstrand y otros, 1995). Varios mAbs, incluyendo L8A4, Y10 y H10 tienen constantes de afinidad (K_A) para unirse a células HC2 20 d2 positivas de EGFRvIII de entre $1,3 \times 10^9$ y $2,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ tras la radioyodación (Reist y otros, 1995).

El mAb anti-EGFRvIII murino L8A4 IgG1 se desarrolló utilizando los protocolos que implican la inmunización de ratones BALB/c con un péptido sintético que representa la única secuencia de EGFRvIII, así como células HC2 20 d2 positivas de EGFRvIII (Wikstrand y otros, 1995). Este mAb precipita específicamente EGFRvIII mutante de 145 kDa, pero no EGFR de tipo salvaje de 170 kDa, y se internaliza en células que expresan EGFRvIII en los 5 minutos después

de la unión al receptor (Reist y otros, 1995). La constante de afinidad para la unión de L8A4 murino al neopéptido de EGFRvIII, determinada mediante la resonancia por plasmón de superficie, es de $2,0 \pm 1,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Reist y otros, 1997). Las construcciones de Fv de cadena única (scFv), basadas en la región variable de L8A4, también se pueden utilizar en lugar del anticuerpo L8A4 completo. Un monómero de scFv se marcó con SIPC y se encontró que tenía un K_A de $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y una fracción inmunorreactiva de 65-80%. Las construcciones multivalentes se crearon mediante la variación de la longitud del enlazador entre los dominios V_L y V_H ; con un enlazador de 5 aminoácidos, se generó un dímero con una K_A de $5,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ medido mediante la resonancia por plasmón de superficie.

Anticuerpos quiméricos

Las dosis repetidas de anticuerpos murinos en humanos según se requiere para una eficacia terapéutica óptima conducen al desarrollo de respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (Tjandra y otros, 1990) que pueden causar reacciones alérgicas o inhibir el marcaje del anticuerpo murino al tumor. Este problema se puede resolver mediante la producción de anticuerpos recombinantes humanos/murinos (también denominados anticuerpos humanizados), que contienen las regiones variables murinas específicas de tumor, unidas a una región constante de inmunoglobulina humana. Se produjo una versión recombinante quimérica de L8A4 (chL8A4), que posee la especificidad anti-EGFRvIII del anticuerpo L8A4 murino junto con los dominios constantes de IgG₂ humanos (para los detalles de la generación de chL8A4, ver Reist y otros, 1997, y referencias en la misma). La IgG₂ humana tiene una afinidad baja para los receptores de Fc; la utilización de sus regiones constantes minimiza de este modo la captación no específica. Después de marcar con ^{125}I - o ^{131}I -SIPC, las propiedades de captación en el tumor de chL8A4 eran similares a las de L8A4 murino. Sin embargo, la captación en tejido normal aumentó 2 veces en 72-120 horas (Reist y otros, 1997), sugiriendo algunas diferencias en el proceso y en la captación en tejido normal en comparación con el anticuerpo murino. Algunos detalles adicionales sobre la producción de anticuerpos quiméricos mediante métodos de recombinación se pueden encontrar en Hoogenboom y otros, 1996, Patente U.S.A. 5.565.332.

Catabolismo de mAbs marcados

Un número de grupos han demostrado que el catabolismo de mAbs marcados y fragmentos es un proceso complejo, dando lugar a la generación de catabolitos marcados múltiples (Garg y otros, 1995; Rogers y otros, 1996; Wu y otros, 1997). Con mAbs radiyodados, una consideración importante es la extensión de la deshalogenación que tiene lugar *in vivo*, un fenómeno que se cree generalmente que está mediado por los enzimas implicados normalmente en el metabolismo de la hormona tiroidea. El hígado, el riñón, tiroides y otros tejidos normales poseen múltiples desyodinasas de especificidad variante para yodotirosinas y yodotironinas (Leonard y Rosenbert, 1977; Visser y otros, 1988; Boye y Laurberg, 1984). De potencial relevancia para el tratamiento de tumores del SNC es el hecho de que las desyodinasas de la hormona tiroidea también se han encontrado en cerebros humanos normales (Campos-Barros y otros, 1996) y en tumores cerebrales humanos (Mori y otros, 1993). Las proteasas también tienen una función en la degradación de mAbs marcados. Las propiedades de la región constante de mAb pueden influir en su resistencia a la proteólisis y a la naturaleza de los catabolitos que se generan. La degradación proteolítica acelerada de mAbs podría tener lugar en tumores debido a las acciones de las proteasas implicadas en la invasión metastática (Liotta y Kohn, 1997). Por ejemplo, la cathepsina B se expresa en gliomas humanos a niveles que parecen correlacionarse con el grado de malignidad (Rempel y otros, 1994; Mikkelsen y otros, 1995; Sivaparthi y otros, 1995). Esta proteasa tiene una amplia especificidad de sustrato y se ha observado que divide los enlaces peptídicos en conjugados de mAb (Li y Meares, 1993).

La internalización de mAbs crea un problema adicional desde la perspectiva del marcaje ya que generalmente da lugar a la exposición del mAb marcado a las numerosas proteasas encontradas en lisosomas. La degradación lisosomal de una diversidad de mAbs marcados utilizando métodos de radiyodación convencionales se caracteriza por la rápida liberación de radioyodo de la célula tumoral *in vitro*, principalmente como yodotirosina (Geissler y otros, 1991, 1992; Novak-Hofer y otros, 1995; Press y otros, 1996; Reist y otros, 1996), y una escasa retención de la radioactividad en xenoinjertos de tumores *in vivo* (van der Jagt y otros, 1992; Reist y otros, 1995; Sharkey y otros, 1997a). El desarrollo de mejores métodos para internalizar mAbs con marcaje requiere una evaluación de catabolitos marcados creados en el compartimento lisosomal, y la capacidad de estas moléculas marcadas para atravesar la membrana lisosomal.

Selección de nucleidos

Muchos protocolos clínicos actuales implican la administración de mAbs marcados con ^{131}I en gliomas quísticos espontáneos y cavidades de resección de gliomas creados quirúrgicamente, y mediante la ruta intratecal para meningitis neoplásicas (Brown y otros, 1996; Bigner y otros, 1995, 1998). La presencia de enfermedad residual mínima hace que estos ajustes sean favorables para la radioinmunoterapia (Sautter-Bihl y otros, 1996) mediante la minimización del impacto de no uniformidades en la expresión de antígenos, el flujo sanguíneo, la permeabilidad y la presión intersticial, así como la barrera del sitio de unión, en la heterogeneidad de la dosis en el tumor (Jain, 1996; Zhu y otros, 1997). Debido a su corto rango en el tejido, las partículas β de baja energía de ^{131}I y las partículas α de ^{211}At se deberían corresponder bien con aplicaciones terapéuticas, tales como las que implican focos de tumores pequeños, láminas delgadas de tumores compartamentales, y células tumorales flotantes. Aunque los emisores β de energía elevada, tales como ^{90}Y , son atractivos para otras aplicaciones terapéuticas, ^{131}I debería ser más útil para tratar micrometástasis ya que puede depositar una fracción más elevada de su energía de descomposición en el tumor (O'Donoghue y otros, 1995; O'Donoghue, 1996; Nahum, 1996).

El diagnóstico inicial y las pruebas clínicas terapéuticas con mAbs marcado se realizaron con ^{131}I . Desde entonces, se han desarrollado métodos para marcar mAbs con muchos otros nucleidos. No obstante, la mayoría de pruebas de radioinmunoterapia clínicas aún utilizan ^{131}I , y existe una fuerte lógica para seguir haciéndolo. Incluso cuando su rayo γ de 364 keV no es ideal para la imagen, permite la monitorización directa de la farmacocinética de una dosis de terapia de mAb marcado con ^{131}I , que proporciona información valiosa que se refiere a la dosimetría específica del paciente (Brown y otros, 1996). Además, se están desarrollando mejores métodos para la imagen de niveles terapéuticos de ^{131}I en tumores (Smith y otros, 1997a, 1997b). Otros nucleidos de radioyodo son más apropiados para la formación de imágenes. Particularmente para aplicaciones cuantitativas, el ^{123}I es un nucleido más atractivo para la imagen de mAbs a través de SPECT (Buehgeger y otros, 1995). La imagen por SPECT se realizó tras la administración intravenosa de ^{125}I marcado con ^{123}I para determinar el efecto de dosis de proteína mAb en proporciones de tejido con tumor con respecto a tejido normal (Schold y otros, 1993). El yodo-124 se puede utilizar para combinar la radioinmunoescintilografía con PET (Arbit y otros, 1995). La disponibilidad de múltiples nucleidos de radioyodo que emiten rayos γ adecuados para la detección externa es una ventaja principal no sólo para aplicaciones clínicas sino también para estudios preclínicos. Los experimentos de marcadores emparejados que utilizan mAbs ^{131}I y ^{125}I (ver Ejemplos 2-4) pueden comparar directamente diferentes métodos de marcaje o mAbs en los mismos animales, y obteniendo así las diferencias en la expresión de antígenos, tamaño del tumor, la hemodinámica, y la velocidad catabólica que pueden existir entre grupos de animales.

Se ha considerado generalmente que la astatina-211 es el emisor α más prometedor para la radioinmunoterapia. En la mayoría de ajustes, su vida media de 7,2 horas es más compatible con la farmacocinética de mAbs y fragmentos de mAbs que los emisores α alternativos ^{212}Bi (61 min) y ^{213}Bi (47 min). Cada descomposición de ^{211}At produce una partícula α de 5,87 a 7,45 MeV, sin emisiones β acompañantes. Una consecuencia accidental de la disminución de la captura de electrones de ^{211}At es la emisión de rayos x de polonio K de 77-92 keV que tienen suficiente energía para permitir el recuento gamma y la formación de imagen externa de distribuciones de ^{211}At mediante métodos de planaridad y SPECT (Turkington y otros, 1993; Johnson y otros, 1995). Un problema significativo que ha dificultado la investigación clínica de mAbs marcados con ^{211}At ha sido la disponibilidad fiable de niveles de actividad suficientes de ^{211}At . Utilizando objetivos de ciclotrones internos desarrollados recientemente, se pueden producir entonces más de 40 mCi/h de ^{211}At (Larsen y otros, 1996; Schwarz y otros, 1998), permitiendo la preparación de niveles suficientes de ^{211}At para permitir estudios clínicos con mAbs marcados con ^{211}At . Las partículas α de ^{211}At tienen un intervalo de 55-70 μm de tejido, una característica que encaja satisfactoriamente con el tratamiento de cánceres extendidos compartimentalmente, incluyendo la meningitis neoplásica, enfermedad micrometastática, y tumores en la circulación, tales como linfomas.

Métodos para marcar mAbs con radioyodo y ^{211}At

Las proteínas marcadas utilizando aproximaciones de yodación directa experimentan frecuentemente una rápida pérdida de marcador *in vivo*. Esos métodos generan principalmente residuos de tirosina marcados, dando lugar al reconocimiento de estas yodotirosinas mediante las desyodinasas implicadas normalmente en el metabolismo de la hormona tiroidea. Los grupos químicos de fórmula (II) se pueden utilizar para evitar este problema. Por ejemplo, el reactivo N-succinimidil 3-yodobenzoato (SIB) se puede sintetizar con un alto rendimiento mediante la yododes-tanilación (Zalutsky y Narula, 1987). SIB explota la rápida eliminación de catabolitos de yodobenzoato del cuerpo, reduciendo una menor captación de radioactividad por los tejidos normales en comparación con el yodo (Zalutsky y Narula, 1988). El grupo relacionado N-succinimidil 3-[^{211}At] astatobenzoato (SAP) se puede preparar de forma similar. Cuando las proteínas se marcan con ^{211}At utilizando métodos de sustitución electrofílica directa, tiene lugar una rápida deshalogenación, incluso bajo condiciones *in vitro* (Aaij y otros, 1975). Utilizando SAP, ha sido posible marcar mAbs con el mantenimiento de su capacidad localizadora de tumores (Zalutsky y otros, 1989b).

SIB y SAB se pueden utilizar para radiohalogenar directamente un ligando, tal como mAb. Aunque la radiohalogenación directa utilizando SIB o SAP disminuye la desyodación, no evitan la pérdida de marcador de las células tumorales después de la internalización de mAbs (Reist y otros, 1996). La estrategia más ampliamente investigada para marcar mAbs de internalización intenta explotar la resistencia de ciertos oligosacáridos a la degradación por hidrolasas lisosomales (Thorpe y otros, 1993). Se han descrito evaluaciones preclínicas con mAbs marcados utilizando conjugados tiramina de celobiosa (TCB) (Ali y otros, 1990; Reist y otros, 1995), inulina (Thorpe y otros, 1993) y dilactitol (Stein y otros, 1995, 1997). En comparación con otros métodos de yodación, la utilización de estos conjugados para marcar mAbs de internalización aumentaba generalmente la retención de radioyodo en células tumorales *in vitro* y en xenoinjertos en tumores *in vivo*. Desafortunadamente, la traducción de estos métodos de marcaje en el dominio clínico se ha visto dificultada por un conjunto de problemas, incluyendo la reticulación y agregación de mAbs, la inmunoreactividad comprometida, la especificidad disminuida en el marcaje de tumores, bajas eficacias de conjugación y actividades específicas, y una mayor retención en tejidos normales, tal como hígado, bazo y riñones (Pittman y otros, 1983; Ali y otros, 1990; Reist y otros, 1995; Press y otros, 1996; Stein y otros, 1995, 1997).

Una estrategia alternativa para marcar mAbs de internalización implica el acoplamiento de un grupo prostético marcado al mAb que está cargado positivamente a pH lisosomal. Las moléculas cargadas positivamente, tales como el Rojo Neutro y la cloroquina son acumuladas rápidamente por los lisosomas (Holtzman, 1989). De este modo, si los catabolitos marcados creados durante la degradación proteolítica de mAbs están cargados positivamente a pH lisosomal, entonces también deberían retenerse en el lisosoma. A efectos de aplicar esta estrategia, se desarrollaron dos grupos químicos cargados positivamente, carboxilato de succinimidil-yodo-piridina (SIPC) y carboxilato de succinimidil-astato-piridina (SAPC) (Garg y otros, 1991, 1993). La utilización de SIPC para marcar mAb L84A dio lugar

a una retención intracelular significativamente aumentada de radioactividad en comparación con otros métodos, con un descenso concomitante en la radioactividad liberada de la célula (ver Ejemplo 1). Esto verificó que un marcador radiohalógeno cargado positivamente unido a un mAb apropiado tiene una retención y resistencia superiores a la degradación en comparación con los marcadores que no están cargados positivamente.

Enlazadores D-aminoácidos

La degradación proteolítica de proteínas en lisosomas dio lugar a una rápida liberación de L-aminoácidos constituyentes de la célula (Reijngoud y Tager, 1977). Esto justifica presumiblemente la liberación de monoyodotirosina de células tumorales tras la internalización de mAbs que han sido marcados mediante métodos convencionales (Geissler y otros, 1991). Los D-aminoácidos no son sustratos naturales para enzimas endógenas (Milton y otros, 1992), incluyendo las presentes en lisosomas (Ehrenreich y Cohn, 1969). Esta invención utiliza uno o más D-aminoácidos en un oligopéptido enlazador entre el mAb y el grupo prostético marcado, que potencia la captura de radioactividad en el interior de la célula tumoral tras la internalización de mAb.

Los estudios de Ehrenreich y Cohn (1969) ofrecen algunas guías con respecto a la naturaleza del enlazador de D-aminoácido. Tras la captación endocítica en lisosomas, se capturaron un dipéptido cargado y un tripéptido neutro, mientras que no fueron captados 6 dipéptidos neutros. Por lo tanto, a efectos de maximizar la retención en lisosomas, el péptido enlazador debería contener múltiples aminoácidos cargados positivamente, preferiblemente acoplados a SIPC o SAPC cargados positivamente.

Los esquemas para preparar dos realizaciones preferentes se muestran en las figuras 1A y 1B. En la figura 1A, el tetrapéptido α -N-Ac-D-Lys-D-Arg-D-Arg-D-Arg (SEC ID No. 1) protegido en el N-terminal, que se puede obtener de un laboratorio de síntesis convencional se marca mediante la reacción con SIPC en presencia de trietilamina y DMF utilizando condiciones previamente descritas (Garg y otros, 1996; Vaidyanathan y Zalutsky, 1997). La arginina se seleccionó para este objetivo porque su cadena lateral es la más básica ($pK_a = 13,2$) de los aminoácidos naturales. El péptido marcado se acopla a continuación al mAb utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) soluble en agua y sulfo N-hidroxisuccinimida en tampón de ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES), pH 4,5-5 (Staros y otros, 1986; Gilles y otros, 1990). El grupo amino terminal se puede dejar en la forma protegida y se podría dividir *in vivo*.

Un procedimiento alternativo implica la adición de un D-Tyr al N-terminal del péptido y el marcaje del péptido utilizando directamente yodógeno (figura 1B). En este caso, el péptido protegido en N-terminal podría consistir, por ejemplo, en α -N-Ac-D-Tyr-D-Arg-D-Arg-D-Arg (SEC ID No. 2). La monoyodo-D-tirosina es más estable a la desyodación *in vivo* que su enantiómero L (Kawai y otros, 1990). Esto está relacionado probablemente con el reconocimiento de la desyodinasa estereoespecífica (Dumas y otros, 1973). Sin embargo, SIPC y SIB son incluso más resistentes a la desyodación, haciendo que el péptido de D-Tyr sea menos útil a pesar de su conveniencia potencial.

La descripción anterior describe, de forma general, la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos, que se dan a conocer en la presente invención con propósitos únicamente de ilustración y sin pretender limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Marcaje de mAbs utilizando N-Succinimidil 5-Halo-3-Piridincarboxilatos

Preparación de SIPC. A partir de ácido 5-bromonicotínico se sintetiza STPC en tres etapas tal como se ha descrito (Garg y otros, 1991) y se utiliza como precursor para la preparación de SIPC y SAPC. Aunque los métodos publicados de marcaje de SIPC han sido efectivos, implican niveles relativamente altos del precursor de estaño, a una temperatura de reacción de 60-65°C y purificación de HPLC. Estas características pueden ser menos que ideales para preparaciones de un nivel de actividad más elevado, particularmente aquellas destinadas a uso clínico. Utilizando un nuevo procedimiento, se puede llevar a cabo la radioyodación de SIPC a temperatura ambiente con un rendimiento mayor a 80% utilizando bastante menos STPC. En este nuevo procedimiento, se añaden 10 μ g de STPC en 10 μ l de $CHCl_3$ en un vial de cristal, y se añaden 2 μ l de HCl 1 N, yoduro [^{131}I] sódico y 20 μ l de N-clorosuccinimida (2 mg/ml en $CHCl_3$). Se centrifuga la mezcla y se hace reaccionar durante 30 minutos. Después de añadir 100 μ l de $CHCl_3$, se purifica el [^{131}I]SIPC mediante HPLC utilizando una columna de sílice eluida con hexano:acetato de etilo:AcOH (65:35:2).

Producción de astatina-211. La astatina-211 se puede producir en un ciclotrón mediante el bombardeo de dianas de metal de bismuto natural con partículas α de 28-MeV a través de la reacción $^{209}Bi(\alpha, 2n)^{211}At$. Se ha descrito detalladamente en una publicación reciente (Larsen y otros, 1996) un sistema interno de diana específicamente diseñado para la producción de ^{211}At . Las características del diseño de esta diana, que han permitido la producción de altos niveles de ^{211}At , incluyen una cara diana curvada, ángulos de incidencia pequeños y monitores de rastreo y conducción de grafito aislados eléctricamente para una monitorización continua de la corriente de haz. Ha sido posible utilizar corrientes de haz altas del ciclotrón sin una excesiva deposición de calor local, lo cual causaría la pérdida de ^{211}At de la diana. Utilizando esta diana, la eficacia de la producción de ^{211}At ha sido aproximadamente de 1 mCi por μA -hr, un nivel considerablemente más alto que aquellas obtenidas con una diana externa. Corrientes de haz de 75 μA o más han sido utilizadas de forma rutinaria. Puede utilizarse un procedimiento de destilación seca para separar ^{211}At de la diana del ciclotrón, y se puede atrapar el ^{211}At con un rendimiento superior al 50% en pequeños volúmenes de NaOH,

ES 2 274 655 T3

CHCl₃, u otros disolventes (Larsen y otros, 1996). Utilizando este método, puede producirse ²¹¹At a niveles que son suficientes para permitir el uso clínico de los radiofármacos marcados con ²¹¹At.

Preparación de SAPC. Este procedimiento fue descrito en una publicación reciente (Foulon y otros, 1998). Se añaden 20 µl de NaOH 0,01 N a un vial que contiene la actividad ²¹¹At (1 mCi en 50 µl de CHCl₃), y después de centrifugar suavemente, la capa orgánica se evapora bajo una corriente de nitrógeno. La actividad se transfiere a un segundo vial y el pH de la solución se ajusta a menos de 5 mediante la adición de ácido acético:cloroformo, 5:95. Se añaden N-clorosuccinimida (10 µl, 13,3 mg/ml en CHCl₃) y STPC (500 µg en 10 µl de CHCl₃) y la reacción continúa a 65°C durante 5 minutos. Se purifica el SAPC mediante HPLC utilizando el mismo sistema descrito que el descrito para el SIPC. Los rendimientos para el SAPC han sido variables. Entre los factores importantes para la optimización se incluyen los niveles de precursor de estaño, tiempo de reacción y temperatura, oxidante y disolvente. La última variable parece ser particularmente importante; se obtuvo SAPC con un rendimiento del 70% cuando se realizó el marcaje en una mezcla de diclorometano y THF.

Acoplamiento de SIPC y SAPC con mAbs. El disolvente orgánico se evapora de las fracciones de HPLC que contienen SIPC o SAPC, y se transfiere el residuo a un pequeño vial de cristal y se evapora hasta sequedad con una corriente de nitrógeno. Se añade el mAb en tampón borato de pH 8,5, y se incuba la mezcla en un agitador rotativo durante 15 minutos. La reacción se finaliza mediante la adición de 0,3 ml de glicina 0,2 M. El mAb marcado se purifica utilizando una columna Sefadex G-25 de 1 x 10 cm. A concentraciones de mAb de 3 mg/ml, se obtienen rutinariamente eficacias del 70% en los acoplamientos.

Ejemplo 2

Evaluación de mAb tras el marcaje

HPLC. Se analiza una alícuota de mAb marcado mediante HPLC de exclusión por tamaño en una columna TSK3000 para determinar el porcentaje de radioactividad presente como agregados, IgG monomérico e impurezas de bajo peso molecular.

Fracción inmunorreactiva. Para los mAbs anti-EGFRvIII, se almacenan homogenatos de xenoinjerto de tumor EGFRvIII-positivo (U87MGΔEGFR o HC2 20 d2) y cerebro de rata normal EGFRvIII-negativo a una temperatura de -135°C hasta que se necesite. Se incuban durante toda una noche aproximadamente 5 ng de mAb marcado a 4°C por triplicado con 100, 300 y 500 mg de cada homogenato y, a continuación, se lavan 3 veces con un 1% albúmina de suero bovino (BSA) enfriada con hielo en una solución salina tamponada de fosfato (PBS). Se calculan fracciones inmunorreactivas de acuerdo con el método de Lindmo y otros (1984).

Constante de afinidad. Se utiliza el análisis de Scatchard para medir tanto la afinidad de unión de mAbs tras el marcaje como el número promedio de receptores/célula. Se incuban a 4°C durante toda la noche como mínimo 10 diluciones en serie de mAb marcado (de 10 ng/ml a 10 µg/ml) por cuadruplicado con 1 x 10⁶ células U87MGΔEGFR que expresan EGFRvIII o células de control negativas del receptor NIH 3T3. Se agrupan las células, se lavan tres veces con BSA/PBS al 1%, y se contabiliza la actividad asociada a células en un contador gamma automatizado. Se analizan los datos mediante el programa de unión de radioligandos RADLIG (Biosoft, Ferguson, MO).

Internalización y procesamiento celular. Se incuban mAbs radiomarcados con células U87MGΔEGFR en exceso de anticuerpos (3 mg/10⁶ células) durante 1 hora a 4°C, y el mAb no unido se extrae mediante un lavado con BSA/PBS al 1%. Se ajusta la temperatura hasta 37°C, y se extraen partes alícuotas para analizar tras 0, 1, 2, 4, 8, y 20 horas. Las células son peletizadas, y se saca el sobrenadante del cultivo para el recuento. Las células se lavan dos veces con un medio Zinc Option (pH 2) para determinar la actividad unida a la superficie. La actividad asociada a las proteínas en el sobrenadante de cultivo se determina mediante la precipitación con TCA al 12,5%, o para experimentos que implican ²¹¹At, metanol. Se representan en función de tiempo (Reist y otros, 1995) la actividad asociada a células internalizadas, células de la superficie, asociada a proteína del sobrenadante y asociada a elementos no proteínicos del sobrenadante. Se puede incluir 25 mM de cloroquina en el medio de incubación para estudiar el efecto de la inhibición de la función lisosomal en el procesamiento celular de los mAbs anti-EGFRvIII marcados (Press y otros, 1990).

Ejemplo 3

Evaluación de la citotoxicidad in vitro

La citotoxicidad de los mAbs internalizados marcados con emisores β y α puede evaluarse *in vitro*. Los cálculos de dosimetría sugieren que la citotoxicidad de los electrones Auger, de las partículas α y las partículas β emitidas desde sitios intracelulares de descomposición son mayores que aquellas que las existentes en la membrana celular, y los datos experimentales *in vitro* obtenidos con un mAb marcado con ¹²⁵I concuerdan con esta predicción (Goddu y otros, 1994; Daghighian y otros, 1996). La citotoxicidad de los mAbs marcados y otros compuestos para células tumorales ha sido investigada bajo condiciones monocelulares (Strickland y otros, 1994), como microcolonias (Larsen y otros, 1998) y en esferoides (Hauck y otros, 1998).

La capacidad de proliferación de las células EGFRvIII-positivas se puede determinar mediante un ensayo clonogénico de dilución limitante. Utilizando ese formato de ensayo, se evaluó la citotoxicidad de m-[²¹¹At]astatobencilgua-

nidina tan sólo en una fracción de supervivencia de aproximadamente 10^{-5} (Strickland y otros, 1994). La línea celular preferente es U87MGΔEGFR, ya que es actualmente la línea primaria utilizada para la generación de xenoinjertos de EGFRvIII positivos *in vivo*. No obstante, otras líneas de expresión de EGFRvIII, tales como HC2 20 d2, NR6M y D1105 también se pueden estudiar ya que difieren con respecto a la velocidad y la extensión en las que se internalizan mAbs anti-EGFRvIII (Reist y otros, 1997). En este ensayo, se cultivan mecánicamente células en crecimiento exponencial, se recuentan en un hemocitómetro y se incuban con concentraciones de actividad variantes de mAb marcado durante 30 minutos en un agitador rotativo a 37°C. Se utiliza una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células/ml para minimizar la eliminación no específica de actividad no unida en el medio. Como control no específico, se realizan incubaciones en las que, como mínimo, un exceso de 100 veces de mAb no marcado se ha añadido a las células. Tras la incubación, las células se centrifugan a 100 g durante 10 minutos y se aspira el sobrenadante. Los gránulos de células se resuspenden, se repite el proceso de lavado, y las células se resuspenden a una concentración de 10^6 células/ml en medio esencial mínimo Zinc Option suplementado con un 15% de suero de ternera fetal. A continuación, las células se pasan a través de 9 diluciones en serie diluidas cinco veces dando lugar a concentraciones de células finales que varían de 10^5 a 0,256 células depositadas por pocillo. Se realizan un total de seis pocillos de replicados para cada concentración de células en evaporación baja, tratados con cultivo de tejido y placas de 96 pocillos de poliestireno. Después de una incubación de 12 días a 37°C en un incubador humidificado, los pocillos de cada placa se califican como crecimiento positivo o crecimiento negativo en base a la presencia o ausencia de, como mínimo, una colonia clonal de 30 o más células. La media de la función de respuesta de las dosis para cada terapia y el número estimado de unidades clonogénicas por ml se calculan utilizando un estimado de Spearman (Johnson y Brown, 1961). La respuesta clonogénica de cada grupo de tratamiento, expresado como el porcentaje de dos controles no tratados, a continuación se representa frente a la actividad media añadida por ml. En paralelo, la captación y retención de radioactividad por las células diana en la superficie celular y los compartimentos intracelulares se miden para permitir el cálculo de la dosimetría, y para estudiar el efecto potencial de la internalización en la citotoxicidad. Los sitios de localización intracelular se observan mediante microscopía de inmunofluorescencia (Reist y otros, 1995).

Ejemplo 4

Evaluación de la eficacia terapéutica en modelos de xenoinjertos

Antes del inicio de los estudios de terapia en animales con tumores, se determinaron la dosis máxima tolerada (MTD) y LD₁₀ (dosis letal para el 10% de los animales). Se suministran a ratones o ratas atímicas normales solución salina o bien incrementos medio-logarítmicos de mAb marcado y, a continuación, siguió una pérdida de peso, síntomas neurológicos y muerte. El peso promedio se monitoriza diariamente, y la autopsia se practica a los animales dentro de las 12 horas después de la muerte para buscar una evidencia histológica de la toxicidad de órganos normales. Los estudios de radioterapia en animales con tumores se realizan a un 80% de la MTD.

Xenoinjertos subcutáneos. Estos estudios se pueden realizar utilizando protocolos descritos previamente (Schuster y otros, 1991). Los ratones con xenoinjertos U87MGΔEGFR subcutáneos progresivamente crecientes se asignan al azar en grupos de 10 animales cuando los tumores alcanzan los 150-200 mm³. A los grupos de 10 animales se administra solución salina, L8A4 no marcado, o dos niveles de actividad de mAb L8A4 marcado y mAb de control no específico P3X63Ag8. La respuesta se evalúa en términos del retraso en el crecimiento y la regresión del tumor. El retraso del crecimiento se define como la diferencia en días entre cuando el tratamiento y los grupos de control alcanzan los 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 mm³. La regresión del tumor se define como dos mediciones consecutivas del volumen menores que el volumen del tumor en el día de tratamiento. La significancia estadística se determina utilizando el test de la suma de rangos de Wilcoxon. Para los cálculos de la dosis de radiación absorbida, las distribuciones en el tejido se miden en grupos paralelos de 5 animales que reciben dosis terapéuticas de mAbs marcados. Estos estudios son necesarios ya que los estudios de distribución de mAb a nivel traza pueden subestimar la dosis de radiación recibida por el tumor debido al crecimiento rápido del xenoinjerto (Lee y otros, 1988). En base a los resultados de las pruebas con dosis únicas, se pueden investigar las pautas terapéuticas con dosis múltiples tal como se ha descrito (Colapinto y otros, 1990).

Xenoinjertos intracraneales. El protocolo seguido es similar al descrito previamente (Colapinto y otros, 1990). En el día previo al tratamiento, los animales se mezclan al azar según el peso corporal, y se utilizan 10 ratones por grupo de tratamiento. Se sacrifican cinco ratones adicionales en el día del tratamiento para confirmar la existencia de tumores y se determina el volumen tumoral promedio presente en el inicio de la terapia. Los experimentos se inician cuando el tamaño del tumor es de 15-20 mm³. Los animales se mantienen en jaulas individuales en una habitación protegida con plomo y se comprueban su supervivencia dos veces al día. Los animales se examinan en su muerte para confirmar la presencia de un tumor intracraneal. La respuesta terapéutica se evalúa como la prolongación de la supervivencia utilizando el estimador límite del producto de Kaplan y Meier (1958).

Meningitis neoplásicas. Estos estudios se pueden realizar en un modelo de rata atímica de meningitis neoplásicas utilizando los protocolos similares a los descritos en una publicación reciente (Zalutsky y otros, 1994). Se colocan catéteres subaracnoides en hembras, ratas atímicas BIG:NIMR-mu[SPF] que pesan 200-250 mg (Fuchs y otros, 1990). Los animales se anestesian con quetamina/xilacina y se colocan en un marco esterotático. Se realiza una incisión sagital de media línea desde el inion hasta el arco laminal de C1, se expone la membrana atlanto-occipital, y la membrana externa y la cisterna magna subyacente se abren con los aumentos utilizando un microscopio de trabajo. Se inserta un catéter PE-10 en el espacio subaracnoide y se pasa a lo largo de la parte posterior de la médula espinal hasta la región lumbar. Después de fijar el catéter en el sitio con epoxi dental, se pasa a través de la piel de

forma lateral a la incisión y se cierra la herida. Los animales se dejan recuperarse y sólo se utilizan aquellos que muestran una función motora y sensorial normal. La meningitis neoplásica se induce mediante la inyección de 5×10^6 células U87MGΔEGFR en $40 \mu\text{l}$ a través del catéter con una jeringa de Hamilton y se inician estudios de terapia 5-8 días después. Grupos de 10 animales reciben dosis graduadas de mAbs marcados o de control. La respuesta terapéutica se evalúa como prolongación de supervivencia utilizando el estimador límite del producto de Kaplan y Meier (1958). Después de la muerte, la columna vertebral y el cráneo se extraen intactos y se procesan para histología tal como se ha descrito (Zalutsky y otros, 1994).

Ejemplo 5

Autorradiografía cuantitativa y dosimetría de radiación

Autorradiografía cuantitativa (QAR). Se utilizó QAR para evaluar la distribución regional de radioactividad en el tumor y el tejido normal adyacente. Se utilizó QAR para estudiar la heterogeneidad del suministro de 81C6 murino en xenoinjertos D-54 MG intracraneales y subcutáneos (Blasberg y otros, 1987), así como para investigar los efectos de la hipertermia localizada en el tumor en la homogeneidad de la deposición de mAb en xenoinjertos subcutáneos (Zalutsky y otros, 1996). QAR se llevó a cabo en un formato de marcador único con animales que reciben mAb marcado con ^{125}I o con ^{211}At . A intervalos de tiempo seleccionados basados en los estudios de distribución en los tejidos, se sacrifican los animales, y los tumores se extraen y se congelan bruscamente en nitrógeno líquido. Los tumores se montan sobre tablas de madera en un medio de montaje M-1 y se cortan por etapas secciones de $20 \mu\text{m}$ en un criomicrotomo a -20°C . Las secciones se colocan en un portamuestras de vidrio, se secan en un calentador de portamuestras a 65°C y se colocan en cintas de película para un periodo de exposición apropiado para el nivel de actividad en la sección. Después de desarrollar la película, las secciones se manchan con hematoxilina y eosina, y se genera una imagen digital para la alineación con la imagen autorradiográfica. La concentración de actividad en las regiones de autorradiografía se cuantifica por comparación con patrones que se preparan mediante la adición de cantidades conocidas de ^{125}I o ^{211}At a homogenatos de cerebro de rata que se congelan y se tratan idénticamente a las muestras del tumor. El análisis de imágenes se puede realizar utilizando un sistema Amersham RAS R-1000 y se puede obtener el programa de análisis de imagen en grano *in situ* de Loats Associates. Dependiendo de la resolución espacial necesaria, el análisis de la imagen se puede llevar a cabo utilizando un dispositivo de formación de imágenes fosfóricas Store 860.

Cálculos de la dosis de radiación absorbida. Se puede utilizar una aproximación MIRD modificada en la que se presume una distribución uniforme de radioactividad. Según se sugiere, en una revisión reciente de la dosimetría de partículas β en tumores experimentales (Leichner y Kwok, 1993), debería considerarse el efecto de la fracción de partículas β absorbidas, particularmente en tumores más pequeños, y la distribución de fuentes heterogéneas en el tumor, que se puede evaluar mediante QAR. Los cálculos para mAbs marcados con ^{211}At se pueden realizar tal como se han descrito (Zalutsky y otros, 1997). Sin embargo, debido a la fluctuación estocástica de dosis en volúmenes de diana pequeños, una valoración realista de la dosis de radiación de ^{211}At absorbida requiere cálculos del nivel microdosimétrico (Humm y otros, 1993). Recientemente se ha descrito un método para calcular la dosimetría a pequeña escala de ^{211}At utilizando distribuciones de longitud de cuerda obtenidas de imágenes histológicas digitalizadas (Akabani y Zalutsky, 1997).

Ejemplo 6

Internalización y retención de mAb L8A4 marcado con ^{125}I o ^{131}I utilizando SIPC

El SIPC se marcó con ^{125}I o ^{131}I mediante la yododestanilación de STPC utilizando N-clorosuccinimida como oxidante (Garg y otros, 1991). Después de 5 minutos de reacción a $60-65^\circ\text{C}$ y purificación por HPLC, se obtuvo el producto con un rendimiento del 60-80%. La eficiencia para el marcaje de mAb L8A4 mediante la reacción con SIPC fue del 52-71% (Reist y otros, 1996), valores que son casi el doble que los obtenidos para la conjugación de TCB a este mAb (Reist y otros, 1995). No se observó ninguna evidencia de la agregación de proteínas mediante HPLC por exclusión de tamaño para L8A4 marcado utilizando SIPC, mientras que un 10-20% del radioyodo estaba presente como agregados en la mayoría de las preparaciones de TCB. Las fracciones inmunorreactivas para L8A4 marcado utilizando SIPC eran más elevadas que las obtenidas cuando este mAb se marcó utilizando Yodógeno o TCB. Se realizaron ensayos *in vitro* para comparar la internalización y el procesamiento celular de L8A4 marcado utilizando Yodógeno, SIPC y SIB (un reactivo que como el SIPC, minimiza desyodación de mAb, pero a diferencia de SIPC, no está cargado positivamente). La utilización de SIPC para marcar L8A4 dio lugar a una retención intracelular de radioactividad significativamente aumentada en comparación con otros métodos, con un descenso concomitante en recuentos de sobrenadante. Por ejemplo, después de 4 horas de incubación a 37°C , el compartimento intracelular tenía un $24,0 \pm 0,9\%$ de la actividad para el mAb marcado utilizando SIPC en comparación con $13,2 \pm 0,5\%$ con SIB, mientras que un $12,2 \pm 0,3\%$ (SIPC) y $36,1 \pm 1,6\%$ (SIB) de la actividad se encontró en el sobrenadante del cultivo celular (figura 2). Los resultados sugieren que la mayor retención celular para mAb marcada utilizando SIPC no está relacionada con la desyodación disminuida.

Ejemplo 7

Internalización, retención y distribución en el tejido de L8A4 marcado con ^{211}At utilizando SAPC

Se sintetizó *N*-succinimidil 5- ^{211}At astuto-3-piridincarboxilato (SAPC) a partir de STPC utilizando *N*-clorosuccinimida como oxidante. La eficacia para marcar L8A4 con SAPC era idéntica a la observada con SIPC. Para L8A4 marcado con ^{211}At , las fracciones inmunorreactivas fueron del 69-89% y la afinidad (K_A) para la unión a la línea celular U87MGΔEGFR fue $(9,7 \pm 1,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Los ensayos de internalización y procesamiento se realizaron tal como se describe para mAbs radiyodados a excepción de que la actividad asociada a la proteína para ^{211}At se midió utilizando metanol en lugar de la precipitación con TCA porque se encontró que el 98% de ^{211}At astatida libre se precipitó en el ensayo con TCA. Se observaron niveles comparables de recuentos intracelulares para L8A4 marcado con ^{211}At y ^{131}I en los puntos de tiempo iniciales, pero había niveles más elevados de actividad para ^{211}At en los sobrenadantes de los cultivos celulares solubles en metanol, sugiriendo una liberación más rápida de catabolitos marcados con ^{211}At . La distribución en el tejido de L8A4 marcado con ^{211}At y ^{131}I se evaluó en ratones atímicos que llevaban xenoinjertos subcutáneos U87MGΔEGFR. Ambos nucleidos mantuvieron los niveles en los tumores constantes durante las 6 a 24 horas del periodo experimental, con una captación ligeramente más elevada para ^{211}At (^{211}At , $21,6 \pm 2,7\%$ ID/g; ^{131}I , $18,7 \pm 2,4\%$ ID/g a las 12 horas). Los niveles de ^{211}At eran algo más elevados que de ^{131}I en bazo, pulmones y estómago, tejidos conocidos por acumular ^{211}At astatida (Garg y otros, 1990).

Ejemplo 8

Unión e internalización in vitro de mAbs marcados con un enlazador de D-aminoácidos cargados positivamente

Se realizó un ensayo *in vitro* de marcadores emparejados para comparar la internalización y procesamiento celular de mAb L8A4 marcado con ^{131}I utilizando Yodógeno y ^{125}I utilizando el método enlazador de oligopéptido de la invención. El anticuerpo monoclonal L8A4 fue marcado utilizando el enlazador de oligopéptidos descrito a continuación. El péptido α -N-Ac-D-Lys-D-Arg-D-Tyr-D-Arg-D-Arg (KRYRR) se obtuvo de un laboratorio de síntesis convencional y se marcó con ^{125}I utilizando el método de Yodógeno. Se utilizó HPLC de fase inversa para aislar KRYRR marcado con ^{125}I con un rendimiento superior al 97%, y el péptido marcado se activó mediante reacciones con sulfa-SM-CC a temperatura ambiente durante 30 minutos. El mAb L8A4 anti-EGFRvIII murino se hizo reaccionar con 2-imino tiolano para generar grupos tiol libres y, a continuación, se hace reaccionar con el conjugado de péptido-L8A4 marcado con ^{125}I activado y se aisló sobre una columna Sefadex G-25-PD10. El rendimiento es de aproximadamente el 35%.

Se utilizó la línea celular U87MGΔEGFR que expresa EGFRvIII, y los resultados se muestran en la figura 3. Los contajes internalizados y totales asociados a la célula fueron significativamente más elevados que el método de marcaje del oligopéptido en los tres puntos de tiempo examinados; las diferencias entre los dos métodos de marcaje aumentaron con el tiempo. Por ejemplo, después de 24 horas de incubación a 37°C , el porcentaje de actividad retenida como recuentos internalizados fue casi cuatro veces más elevado con el oligopéptido (yodógeno, $5,0 \pm 1,2\%$; oligopéptido, $18,8 \pm 5,4\%$). Asimismo, la actividad total asociada a la célula (internalizada + superficie celular) fue 5,3 veces más elevada para oligopéptido-L8A4 marcado con ^{125}I en este tiempo (yodógeno, $11,1 \pm 1,0\%$; péptido, $58,3 \pm 12,4\%$). En comparación, cuando se utilizó el péptido utilizado por Govindan y otros (1998) y Stein y otros (1998) para marcar un mAb de internalización, se observó un incremento de dos o tres veces en la actividad asociada a la célula en comparación con el mAb marcado directamente.

Ejemplo 9

Captación en el tumor de mAbs marcados con un enlazador de D-aminoácidos cargados positivamente

La distribución del tejido de L8A4 murino marcado con ^{125}I utilizando el método del oligopéptido y con ^{131}I utilizando Yodógeno se compararon directamente en ratones atímicos que llevaban xenoinjertos subcutáneos de glioma humano U87MGΔEGFR que expresa EGFRvIII. El anticuerpo monoclonal L8A4 se marcó tal como se describe en el Ejemplo 8. La captación en el tumor de los dos mAbs marcados se muestra en la figura 4. A todos los puntos de tiempo se observaron niveles de tumor significativamente más elevados. El método de marcaje del péptido aumentó la retención en el tumor de la actividad de radioyodo en un $194 \pm 38\%$ a las 12 horas, $296 \pm 47\%$ a las 24 horas, $468 \pm 91\%$ a las 36 horas, $542 \pm 68\%$ a las 48 horas, y $547 \pm 69\%$ a las 72 horas. En comparación, el péptido descrito por Govindan y otros (1998) y Stein y otros (1998) aumentó la captación en el tumor en sólo un 170% a las 24 horas y un 270% a las 72 horas. Además, la ventaja de liberación en el tumor conseguida con el método del oligopéptido era considerablemente mayor que la observada en los estudios previos con el marcaje de L8A4 murino utilizando otros métodos (TCB y SIPC) desarrollados para la radiyodación de mAbs de internalización (Reist y otros, 1995, 1996, 1997).

Ejemplo 10

Captación en la tiroides de radioactividad liberada de mAbs marcados con un enlazador de D-aminoácidos cargados positivamente

La acumulación en la tiroides se utiliza generalmente como un indicador de la deshalogenación de compuestos radiyodados *in vitro*. Tal como se muestra en la figura 5, los niveles en la tiroides de L8A4 marcados utilizando

el método del oligopéptido de la presente invención (tal como se describe en el Ejemplo 8) fueron $52 \pm 9\%$, $29 \pm 5\%$, $17 \pm 1\%$, $11 \pm 1\%$, y $11 \pm 2\%$ de los de mAbs marcados utilizando yodógeno a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas, respectivamente.

5 Ejemplo 11

Proporción de captación en el tumor respecto a sangre de radioactividad liberada de mAbs marcados con un enlazador de D-aminosácidos cargados positivamente

- 10 Con las técnicas de marcaje previas, las proporciones de captación de marcador en el tumor con respecto a la sangre nunca fueron superiores a 1 con L8A4 murino marcado utilizando yodógeno (Reist y otros, 1995). En cambio, las proporciones del tumor con respecto a la sangre para el mAb marcado utilizando el método de oligopéptido de la presente invención (tal como se describe en el Ejemplo 8) aumentó desde $1,8 \pm 0,6$ a las 12 horas hasta $7,2 \pm 1,0$ a las 72 horas (figura 6). Estas proporciones fueron significativamente más elevadas que las obtenidas con otros métodos de
15 marcaje desarrollados para la utilización con mAbs de internalización (Reist y otros, 1995, 1996, 1997).

Referencias

- Aaij, C., Tschroots, W.R.J.M., Lindner, L. y Feltkamp, T.E.W. (1975)** The preparation of astatine labelled proteins. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 26:25-30.
- Akabani, G. and Zalutsky, M.R. (1997)** Microdosimetry of astatine-211 using histological images: application to bone marrow. *Radiat. Res.* 148:599-607.
- 25 **Ali, S. A., Warren, S. D., Richter, K. Y., Badger, C. C., Eary, J. F., Press, O. W., Krohn, K. A., Bernstein, I. D., y Nelp, W. B. (1990)** Improving the tumor retention of radioiodinated antibody: aryl carbohydrate adducts. *Cancer Res.* 50:783s-788s.
- Arbit, E., Cheung, N.K., Yeh, S.D., Daghighian, F., Zhang, J.J., Cordon-Cardo, C., Pentlow, K., Canete, A., Finn, R. y Larson, S.M. (1995)** Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialoganglioside GD2 in
30 human brain tumors. *Eur. J. Nucl. Med* 22:419-425.
- Baselga, J. y Mendelsohn, J. (1994)** Receptor blockade with monoclonal antibodies as anti-cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 64:127-154.
- 35 **Bast Jr. R.C., Zalutsky, M.R., y Frankel, A. (1997)** Monoclonal Serotherapy. In: Holland, J.F., Frei, E. III., Bast, R.C., Jr., Kufe, D.W., Morton, D.L., Weichselbaum, R.R., eds. *Cancer Medicine* 4th Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, p.1245-1262.
- 40 **Bigner, D.D., Brown, M., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., McLendon, R.E., Bigner, S.H., Wikstrand, C.J., Pegram, C.N., Kerby, T., y Zalutsky, M.R. (1995)** Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with ^{131}I -radiolabeled monoclonal antibodies antitenascin 81C6 and anti-chondroitin proteoglycan sulfate Me1-14 F(ab')₂ - A preliminary report. *J. Neuro-Oncol.* 24:109-122.
- 45 **Bigner, D.D., Brown, M.T., Friedman, A.H., Coleman, R.E., Akabani, G., Friedman, H.S., Thorstad, W.L., McLendon, R.E., Bigner, S.H., Zhao, X.-G., Pegram, C.N., Wikstrand, C.J., Herndon II, J.E., Vick, N.A., Paleologos, N., Cokgor, I., y Zalutsky, M.R.** Iodine-131-labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: Phase I trial results. (presentado, 1998).
- 50 **Blasberg, R.G., Nakagawa, H., Bourdon, M.A., Groothuis, D.R., Patlak, C.S., y Bigner, D.D. (1987)** Regional localization of a glioma-associated antigen defined by monoclonal antibody 81C6 *in vivo*: kinetics and implications for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 47:4432-4443.
- 55 **Boye, N. y Laurberg, P. (1984)** Deiodination of T4 to T3 and rT3 by microsomes from normal human thyroid tissue. *Mol. Cell Endocrinol.* 37:295-299.
- Bradwell, y otros (1985)** In *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*. Baldwin y otros, Eds., páginas. 65-85, Academic Press.
- 60 **Brady, L.W., Miyamoto, C., Woo, D.V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadparvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, T., Lazzaro, B., Nair, S., McCormack, T., Nieves, J., Morabito, M., y Eshleman, J. (1992)** Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a phase II trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22:225-230.
- 65 **Britton, K.E. y Granowska, M. (1996)** Immunoscintigraphy - importance for researchers and patients. *Acta Oncologica* 35:313-317.

- 5 **Brown, M.T., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., McLendon, R.E., Reiman, R., Felsberg, G.J., Tien, R.D., Bigner, S.H., Zalutsky, M.R., Zhao, X.G., Wikstrand, C.J., Pegram, C.N., Herndon II, J.E., Vick, N.A., Paleologos, N., Fredericks, R.K., Schold, Jr., S.C., y Bigner, D.D. (1996)** Intrathecal ^{131}I -labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with leptomeningeal neoplasms or primary brain tumor resection cavities with subarachnoid communication: Phase I trial results. *Clin. Cancer Res.* 2:963-972.
- 10 **Buchegger, F., Mach, J.-P., Pelegrin, A., Gillet, M., Vogel, C.A., Buclin, T., Ryser, J.E., Delaloye, B., y Delaloye, A.B. (1995)** Radiolabeled chimeric anti-CEA antibody compared with the original mouse monoclonal antibody for surgically treated colorectal carcinoma. *J. Nucl. Med.* 36:420-429.
- Campos-Barros, A., Hoell, T., Musa, A., Sampaolo, S., Stoltenburg, G., Pinna, G., Eravci, M., Meinhold, H., y Baumgartner, A. (1996)** Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:2179-2185.
- 15 **Colapinto, E.V., Zalutsky, M.R., Archer, G.E., Noska, M.A., Friedman, H.S., y Bigner, D.D. (1990)** Radioimmunotherapy of intracerebral human glioma xenografts with ^{131}I -labeled F(ab')₂ fragments of monoclonal antibody Mel-14. *Cancer Res.* 50:1822-1827.
- 20 **Daghighian, F., Barendswaard, E., Welt, S., Humm, J., Scott, A., Willingham, M.C., McGuffie, E., Old, L.J., y Larson, S.M. (1996)** Enhancement of radiation dose to the nucleus by vesicular internalization of iodine-125-labeled A33 monoclonal antibody. *J. Nucl. Med.* 37:1052-1057.
- De Santes, K., Slamon, D., Anderson, S.K., Shepard, M., Fendly, B., Maneval, D., y Press, O. (1992)** Radio-labeled antibody targeting of the HER-2/neu oncoprotein. *Cancer Res.* 52:1916-1923.
- 25 **Dumas, P., Maziere, B., Autissier, N., y Michel, R. (1973)** Specificity of thyroidal and hepatic microsomal iodotyrosine deiodinase. *Biochem. Biophys. Acta* 293:36-47.
- 30 **Ehrenreich, B.A. y Cohn, Z.A. (1969)** The fate of peptides pinocytosed by macrophages *in vitro*. *J. Exp. Med.* 129:227-243.
- Foulon, C.F., Alston, K.L. y Zalutsky, M.R. (1998)** Astatine-211 labeled biotin conjugates resistant to biotinidase for use in pretargeted radioimmunotherapy. *Nucl. Med Biol.* 25:81-88.
- 35 **Fraker, P.J., and Speck Jr., J.C. (1978)** Protein y cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphrenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 849-857.
- 40 **Fuchs, H.E., Archer, G.E., Colvin, O.M., Bigner, S.H., Schuster, J.M., Fuller, G.N., Muhlbaier, L.H., Schold, S.C. Jr., Friedman, H.S., y Bigner, D.D. (1990)** Activity of intrathecal 4-hydroperoxycyclophosphamide in a nude rat model of human neoplastic meningitis. *Cancer Res.* 50: 1954-1959.
- Garcia de Palazzo, I., Adams, G.P., Sundareshan, P., Wong, A.J., Testa, J.R., Bigner, D.D., y Weiner, L.M. (1993)** Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 53: 3217-3220.
- 45 **Garg, P.K., Harrison, C.L., and Zalutsky, M.R. (1990)** Comparative tissue distribution of the alpha emitter ^{211}At and ^{131}I as labels of a monoclonal antibody and F(ab')₂ fragment. *Cancer Res.* 50: 3514-3520.
- 50 **Garg, S., Garg, P.K. y Zalutsky, M.R. (1991)** N-succinimidyl-5-(trialkylstannyl)-3-pyridine carboxylates: a new class of reagents for protein radioiodination. *Bioconjugate Chem.* 2: 50-56.
- Garg, S., Garg, P.K., Zhao, X-G., Friedman, H.S., Bigner, D.D., y Zalutsky, M.R. (1993)** Radioiodination of a monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Nucl. Med. Biol.* 20: 835-842.
- 55 **Garg, P.K., Alston, K.L., y Zalutsky, M.R. (1995)** Catabolism of radioiodinated murine monoclonal antibody F(ab')₂ fragment labeled using N-succinimidyl 3-iodobenzoate and iodogen methods. *Bioconjugate Chem.* 6:493-501.
- 60 **Garg, P.K., Alston, K.L., Welsh, P.C., y Zalutsky, M.R. (1996)** Enhanced binding and inertness to dehalogenation of α -melanotropic peptides labeled using N-succinimidyl 3-iodobenzoate. *Bioconjugate Chem.* 7: 233-239.
- Geissler, F., Anderson, S.K., y Press, O. (1991)** Intracellular catabolism of radiolabeled anti-CD3 antibodies by leukemic T cells. *Cell Immunol.* 137: 96-110.
- 65 **Gilles, M.A., Hudson, A.Q., and Borders Jr., C.I. (1990)** Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Anal. Biochem.* 184: 244-248.

- Goddu, S.M., Rao, D.V., y Howell, R.W. (1994)** Multicellular dosimetry for micrometastases: dependence of self-dose versus cross-dose to cell nuclei on type and energy of radiation and subcellular distribution of radionuclides. *J. Nucl. Med* 35: 521-530.
- 5 **Govindan, S.V., Goldenberg, D.M., Stein, R., Mattes, M.J., Shih, L.B., McBride, W.J., Hansen, H.J., y Griffiths, G.L. (1998)** Peptide-Based Residualizing Radioiodine Labels for Radioimmunotherapy. *J. Nuclear Med* 39: 223P.
- 10 **Hansen, H.J., Ong, G.L., Diril, H., Valdez, A., Roche, P.A., Griffiths, G.L., Goldenberg, D.M., y Mattes, M.J. (1996)** Internalization and catabolism of radiolabeled antibodies to the MHC class-II invariant chain by B-cell lymphomas. *Biochem J.* 320: 293-300.
- 15 **Hauck, M.L., Larsen, R.H., Welsh, P.C., y Zalutsky, M.R. (1998)** Cytotoxicity of α -particle-emitting astatine-211-labelled antibody in tumour spheroids: no effect of hyperthermia. *Br. J. Cancer* 77: 753-759.
- 20 **Holtzman, E. (1989)** Lysosomes, páginas. 95-100. Plenum Press, N.Y. Hoogenboom, H. R. J. M., Baier, M., Jespers, L. S. A. T., y Winter, G. P. (1996) Production of chimeric antibodies-a combinatorial approach. U.S. Patent 5,565,332, assigned to Medical Research Council, London and Cambridge Antibody Technology, Melbourn, England.
- 25 **Humm, J.L., Roeske, J.C., Fisher, D.R., y Chen, G.T.Y. (1993)** Microdosimetric concepts in radioimmunotherapy. *Med. Phys.* 20: 535-541.
- Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., Zalutsky, M.R., Fuller, G.N., Archer, G.E., Freidman, H.S., Kwatra, M.M., Bigner, S.H., y Bigner, D.D. (1990).** Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4207-4211.
- Jain, R.K. (1996)** Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science* 271: 1079-1080.
- 30 **Johnson, E.A., y Brown, B.W., Jr. (1961)** The Spearman estimator for serial dilution assays. *Biometrics* 17: 79-88.
- 35 **Johnson, E.L., Turkington, T.G., Jaszczak, R.J., Vaidyanathan, G., Green, K.L., Coleman, R.E., y Zalutsky, M.R. (1995)** Quantitation of ^{211}At in small volumes for evaluation of targeted radiotherapy in animal models. *Nucl. Med. Biol.* 22: 45-54.
- Kairemo K.J.A. (1996)** Radioimmunotherapy of solid cancers. *Acta Oncologica* 35: 345-355.
- 40 **Kaminski, M.S., Zasadny, K.R., Francis, I.R., Fenner, M.C., Ross, C.W., Milik, A.W., Estes, J., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Glenn, S.D., y Wahl, R.L. (1996)** Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 14: 1974-1981.
- 45 **Kaplan, E.L. y Meier, P. (1958)** Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer. Statist. Assoc.* 53: 457-481.
- Kawai, K., Fujibayashi, Y., Saji, H., Konishi, J., Kubodera, A., y Yokoyama, A. (1990)** Monoiodo-Dtyrosine, an artificial amino acid radiopharmaceutical for selective measurement of membrane amino acid transport in the pancreas. *Nucl. Med Biol.* 17: 369-376.
- 50 **Larsen, R.H., Wieland, B.W., y Zalutsky, M.R. (1996)** Evaluation of an internal cyclotron target for the production of astatine-211 via the $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ reaction. *Appl. Radiat. Isotop.* 47: 135-143.
- 55 **Larsen, R.H., Akabani, G., Welsh, P., y Zalutsky, M.R. (1998)** The cytotoxicity and microdosimetry of ^{211}At -labeled chimeric monoclonal antibodies on human glioma and melanoma cells *in vitro*. *Radiat. Res.*, 149: 155-162.
- Larson, S.M. (1995)** Improving the balance between treatment and diagnosis: a role for radioimmunodetection. *Cancer Res (Suppl.)* 55: 5756s-5758s.
- 60 **Laske, D.W., Youle, R.J., y Oldfield, E.H. (1997)** Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nature Medicine* 3: 1362-1368.
- 65 **Lee, Y.-S., Bullard, D.E., Zalutsky, M.R., Coleman, R.E., Friedman, H.S., Colapinto, E.V., and Bigner, D.D. (1988)** Therapeutic efficacy of anti-glioma mesenchymal extracellular matrix ^{131}I radiolabeled murine monoclonal antibody in a human glioma xenograft model. *Cancer Res.* 48: 559-566.
- Leichner, P.K. y Kwok, C.S. (1993)** Tumor dosimetry in radioimmunotherapy: methods of calculation for beta particles. *Med. Phys.* 20: 529-534.

Leonard, J.L. y Rosenbert, I.N. (1977) Subcellular distribution of thyroxine 5'-deiodinase in the rat kidney: a plasma membrane location. *Endocrinology* 103: 274-280.

Li, M. y Meares, C.F. (1993) Synthesis, metal chelate stability studies, and enzyme digestion of a peptide-linked DOTA derivative and its corresponding radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* 4: 275-283.

Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedoroko, J. y Bunn, P.A. Jr. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods* 72: 77-89.

Liotta, L.A. y Kohn, E.C. (1997) Invasion and metastasis. In: Holland, J.F., Frei, E. III., Bast, R.C., Jr., Kufe, D.W., Morton, D.L., y Weichselbaum, R.R., eds. *Cancer Medicine* 4ª Edición. Baltimore: Williams y Wilkins, páginas 165-180.

March, J. (1977) Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 2ª Edición. *McGraw-Hill*, New York.

Mattes, M.J., Griffiths, G.L., Diril, H., Goldenberg, D.M., Ong, G.L., y Shih, L.B. (1994) Processing of antibody-radioisotope conjugates after binding to the surface of tumor cells. *Cancer* 73: 787-793.

Mikkelsen, T., Yan, P.-S., Ho, K.-L., Sameni, M., Sloane, B.F., y Rosenblum, M.L. (1995) Immunolocalization of cathepsin B in human glioma: implications for tumor invasion and angiogenesis. *J. Neurosurg.* 83: 285-290.

Milton, R.C., Milton, S.C., y Kent, S.B. (1992) Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity. *Science* 256: 1403-1404.

Mori, K., Yoshida, K., Kayama, T., Kaise, N., Fukazawa, H., Kiso, Y., Kikuchi, K., Aizawa, A., y Abe K. (1993) Thyroxine 5-deiodinase in human brain tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 1198-1202.

Moscatoello, D.K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L., y Wong, A.J. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 55: 5536-5539.

Nahum, A.E. (1996) Microdosimetry and radiocurability: modelling targeted therapy with b-emitters. *Phys. Med Biol.* 41: 1957-1972.

Novak-Hofer, I., Amstutz, H.P., Morgenthaler, J.J., y Schubiger, P.A (1994) Internalization and degradation of monoclonal antibody chCE7 by human neuroblastoma cells. *Int. J. Cancer* 57: 427-432.

O'Donoghue, J.A., Bardiès, M., y Wheldon, T.E. (1995) Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted radiotherapy with betaemitting radionuclides. *J. Nucl. Med* 36: 1902-1909.

O'Donoghue, J.A. (1996) Optimal therapeutic strategies for radioimmunotherapy. *Recent Results Cancer Res.* 141: 77-99.

Pittman, R. C., Carew, T. E., Glass, C. K., Green, S. R., Taylor, C. A., Jr., y Attie, A. D. (1983) A radioiodinated, intracellularly trapped ligand for determining the sites of plasma protein degradation *in vivo*. *Biochem J.* 212: 791-800.

Press, O.W., DeSantes, K., Anderson, S.K., y Geissler, F. (1990) Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *Cancer Res.* 50: 1243-1250.

Press, O.W., Howell-Clark, J., Anderson, S., y Bernstein, I. (1994) Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells. *Blood* 83: 1390-1397.

Press, O.W., Eary, J.F., Appelbaum, F.R., Martin, P.J., Nelp, W.B., Glenn, S., Fisher, D.R., Porter, B., Matthews, D.C., Gooley, T., y Bernstein, I.D. (1995) Phase II trial of ¹³¹I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas. *Lancet* 346: 336-340.

Press, O.W., Shan D., Howell-Clark, J., Eary, J., Appelbaum, F.R., Matthews, D., King, D.J., Haines, A.M.R., Hamann, P., Hinman, L., Schochat, D., y Bernstein, I.D. (1996) Comparative metabolism and retention of iodine-125, yttrium-90, and indium-111 radioimmunoconjugates by cancer cells. *Cancer Res.* 56: 2123-2129.

Reijngould, D.J. y Tager, J.M. (1977) The permeability properties of the lysosomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 472: 419-439.

Reist, C.J., Archer, G.E., Kurpad, S.N., Wikstrand, C.J., Vaidyanathan, G., Willingham, M.C., Moscatello, D.K., Wong, A.J., Bigner, D.D., y Zalutsky, M.R. (1995) Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor va-

riant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.* 55: 4375-4382.

Reist, C.J., Garg, P.K., Alston, K.L., Bigner, D.D., y Zalutsky, M.R. (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 56: 4970-4977.

Reist, C.J., Batra, S.K., Pegram, C.N., Bigner, D.D. y Zalutsky, M.R. (1997) *In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. *Nucl. Med Biol.* 24: 639-647.

Rempel, S.A., Rosenblum, M.L., Mikkelsen, T., Yan, P.-S., Ellis, K.D., Golembieski, W.A., Sameni, M., Rozhin, J., Ziegler, G., y Sloane, B.F. (1994) Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion. *Cancer Res.* 54: 6027-6031.

Rogers, B.E., Anderson, C.J., Connett, J.M., Guo, L.W., Edwards, W.B., Sherman, E.L.C., Zinn, K.R., y Welch, M.J. (1996) Comparison of four bifunctional chelates for radiolabeling monoclonal antibodies with copper radioisotopes: biodistribution and metabolism. *Bioconjugate Chem.* 7: 511-522.

Sautter-Bihl, M.-L., Herbold, G., y Bihl, H. (1996) Minimal residual disease: a target for radioimmunotherapy with ^{131}I -labeled monoclonal antibodies? Some dosimetric considerations. *Recent Results Cancer Res.* 141: 67-75.

Schold, S.C. Jr., Zalutsky, M.R., Coleman, R.E., Glantz, M.J., Friedman, A.H., Jaszczak, R.J., Bigner, S.H. y Bigner, D.D. (1993) Distribution and dosimetry of I-123-labeled monoclonal antibody 81C6 in patients with anaplastic glioma. *Invest. Radiol.* 28: 488-496.

Schuster, J.M., Garg, P.K., Bigner, D.D. y Zalutsky, M.R. (1991) Improved therapeutic efficacy of a monoclonal antibody radioiodinated using N-succinimidyl-3-(tri-n-butylstannyl)benzoate. *Cancer Res.* 51: 4164-4169.

Schwarz, U.P., Plascjak, P., Beitzel, M.P., Gansow, O.A., Eckelman, W.C., y Waldmann, T.A. (1998) Preparation of ^{211}At -labeled humanized anti-Tac using ^{211}At produced in disposable internal and external bismuth targets. *Nucl. Med Biol.* 25: 89-93.

Sharkey, R.M., Behr, T.M., Mattes, M.J., Stein, R., Griffiths, G.L., Shih, L.B., Hansen, H.J., Blumenthal, R.D., Dunn, R.M., Juweid, M.E., y Goldenberg, D.M. (1997a) Advantage of residualizing radiolabels for an internalizing antibody against the B-cell lymphoma antigen, CD22. *Cancer Immunol. Immunother.* 44: 179-188.

Sivaparvathi, M., Sawaya, R., Wang, S.W., Rayford, A., Yamamoto, M., Liotta, L.A., Nicolson, G.L., y Rao, J.S. (1995) Overexpression and localization of cathepsin B during the progression of human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis* 13: 49-56.

Smith, M.F., Jaszczak, R.J., y Wang, H. (1997a) Lead and tungsten pinhole inserts for I-131 SPECT tumor imaging: experimental measurements and photon transport simulations. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 44: 74-82.

Smith, M.F., Jaszczak, R.J., y Wang, H. (1997b) Pinhole aperture design for ^{131}I tumor imaging. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* 44: 1154-1160.

Staros, J.V., Wright, R.W., y Swingle, D.M. (1986) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide coupling reactions. *Anal. Biochem.* 156: 220-222.

Stein, R., Goldenberg, D. M., Thorpe, S. R., Basu, A., y Mattes, M. J. (1995) Effects of radiolabeling monoclonal antibodies with a residualizing iodine radiolabel on the accretion of radioisotope in tumors. *Cancer Res.* 55: 3132-3139.

Stein, R., Goldenberg, D.M., Thorpe, S.R. y Mattes, M.J. (1997) Advantage of a residualizing iodine label for radioimmunotherapy of xenografts of human non-small-cell carcinoma of the lung. *J. Nucl. Med* 38: 391-395.

Stein, R., Govindan, S.V., Mattes, M.J., Griffiths, G.L., Hansen, H.J., y Goldenberg, D.M. (1998) A non-metabolizable DTPA-peptide (DPEP) approach for production of a residualizing iodine radiolabel for targeting human lung cancer xenografts. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 39: 380.

Strickland, D.K., Vaidyanathan, G., y Zalutsky, M.R. (1994) Cytotoxicity of alpha-particle-emitting m- ^{211}At astatobenzylguanidine on human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 54: 5414-5419.

Thorpe, S. R., Baynes, J. W., y Chroneos, Z. C. (1993) The design and application of residualizing labels for studies of protein catabolism. *FASEB J.*, 7: 399-405.

Tjandra, J. J., Ramadi, L., y McKenzie, I. F. (1990) Development of hyman anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol. Cell Biol.* 68: 367-376.

Turkington, T.G., Zalutsky, M.R., Jaszczak, R.J., Garg, P., Vaidyanathan, G., y Coleman, R.E. (1993) Measuring astatine-211 distributions with SPECT. *Phys. Med Biol.* 38: 1121-1130.

Vaidyanathan, G. y Zalutsky, M.R. (1997) Fluorine-18 labeled [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH, an α -melanocyte stimulating hormone analogue. *Nucl. Med. Biol.* 24: 171-178.

Van der Jagt, R.H.C., Badger, C.C., Appelbaum, F.R., Press, O.W., Matthews, D.C., Eary, J.F., Krohn, K.A., y Bernstein, I.D. (1992) Localization of radiolabeled antimyeloid antibodies in a human acute leukemia xenograft tumor model. *Cancer Res.* 52: 89-94.

Visser, T.J., Kaptein, E., Terpstra, O.T., y Krenning, E.P. (1988) Deiodination of thyroid hormone by human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 17-24.

Wikstrand, C.J., Hale, L.P., Batra, S.K., Hill, M.L., Humphrey, P.A., Kurpad, S.N., McLendon, R.E., Moscatello, D., Pegram, C.N., Reist, C.J., Traweek, T., Wong, A.J., Zalutsky, M.R., y Bigner, D.D. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.* 55: 3140-3148.

Wikstrand, C.J., McLendon, R.E., Friedman, A.H., y Bigner, D.D. (1997) Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res.* 57: 4130-4140.

Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., y Vogelstein, B. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2965-2969.

Wu, C., Jagoda, E., Brechbiel, M., Webber, K.O., Pastan, I., Gansow, O., y Eckelman, W.C. (1997) Biodistribution and catabolism of Ga-67-labeled anti-Tac dsFv fragment. *Bioconjugate Chem.* 8: 365-369.

Xu, F.J., Yu, Y.H., Bae, D.S., Zhao, X.-G., Slade, S.K., Boyer, C.M., Bast, Jr., R.C. y Zalutsky, M.R. (1997) Radioiodinated antibody targeting of the HER-2/neu oncoprotein. *Nucl. Med Biol.* 24: 451-459.

Zalutsky, M.R. y Narula, A.S. (1987) A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. [Part A]* 38: 1051-1055.

Zalutsky, M.R., y Narula, A.S. (1988) Astatination of proteins using an N-succinimidyl tri-n-butylstannyl benzoate intermediate. *Appl. Radiat. Isotop.* 39: 227-232.

Zalutsky, M.R., Garg, P.K., Friedman, H.S. y Bigner, D.D. (1989b) Labeling monoclonal antibodies and F(ab')₂ fragments with the alpha particle emitting nuclide astatine-211: preservation of immunoreactivity and *in vivo* localizing capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7149-7153.

Zalutsky, M.R., McLendon, R.E., Garg, P.K., Archer, G.E., Schuster, J.M., y Bigner, D.D. (1994) Radioimmunotherapy of neoplastic meningitis in rats using an alpha-particle-emitting immunoconjugate. *Cancer Res.* 54: 4719-4725.

Zalutsky, M.R., Schuster, J.M., Garg, P.K., Archer, Jr., G.E., Dewhirst, M.W., y Bigner, D.D. (1996) Two approaches for enhancing radioimmunotherapy: alpha emitters and hyperthermia. *Recent Results Cancer Res.* 141: 101-122.

Zalutsky, M.R., Stabin, M., Larsen, R.H. y Bigner, D.D. (1997) Tissue distribution and radiation dosimetry of astatine-211-labeled chimeric 81C6, an α -particle emitting immunoconjugate. *Nucl. Med Biol.* 24: 255-262.

Zhu, H., Baxter, L.T., y Jain, R.K. (1997) Potential and limitations of radioimmunodetection and radioimmunotherapy with monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med* 38: 731-741.

REIVINDICACIONES

1. Composición para marcaje interno de una célula, que comprende

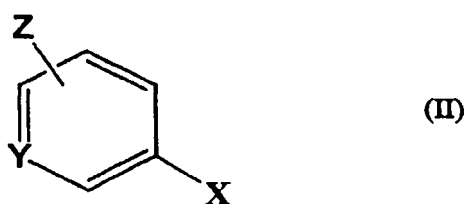
un ligando que se une específicamente a EGFRvIII y es internalizado por la célula, en la que el ligando se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, y un polipéptido sintético;

un oligopéptido que comprende, como mínimo, un residuo de aminoácido cargado positivamente y, como mínimo, un residuo D-aminoácido, de manera que el oligopéptido no comprende dos o más L-aminoácidos contiguos, en la que dicho oligopéptido está unido covalentemente al ligando; y

un marcador que está unido covalentemente al oligopéptido.

2. Composición, según la reivindicación 1, en la que, si el oligopéptido comprende dos o más L-aminoácidos, los L-aminoácidos están separados entre sí por uno o más aminoácidos cargados positivamente.

3. Composición, según la reivindicación 1, en la que el marcador es un grupo de fórmula (II):



en la que X es un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo amino, carboxilo, o sulfhidrilo; en la que Y se selecciona del grupo que consiste en C y N; y

en la que Z se selecciona del grupo que consiste en F, Br, I, At y M(Alk)₃; en la que M se selecciona del grupo que consiste en Si, Sn y Hg; en la que Alk se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, y hexilo.

4. Composición, según la reivindicación 3, en la que el marcador se selecciona del grupo que consiste en 5-yodo-3-piridincarboxilato, 3-yodobenzoato, 3-(tri-n-butilestanil)benzoato, 5-(tri-n-butilestanil)-3-piridincarboxilato, y 5-astato-3-piridincarboxilato, 3-yodoanilina, 4-yodoanilina, 3-astatoanilina, 4-astatoanilina, 3-tributilestanil anilina y 4-tributilestanil anilina.

5. Composición, según la reivindicación 1, en la que el ligando es un anticuerpo monoclonal.

6. Composición, según la reivindicación 1, en la que el ligando es un anticuerpo quimérico recombinante.

7. Composición, según la reivindicación 1, en la que el ligando es un anticuerpo humanizado.

8. Composición, según la reivindicación 1, en la que el ligando se une selectivamente a una célula tumoral.

9. Composición, según la reivindicación 1, en la que el oligopéptido comprende D-Tyr.

10. Composición, según la reivindicación 9, en la que el oligopéptido comprende adicionalmente D-Arg.

11. Composición, según la reivindicación 9, en la que el oligopéptido comprende adicionalmente, como mínimo, tres residuos D-Arg.

12. Composición, según la reivindicación 1, en la que el oligopéptido comprende D-Lys.

13. Composición, según la reivindicación 12, en la que el oligopéptido comprende adicionalmente D-Arg.

14. Composición, según la reivindicación 12, en la que el oligopéptido comprende adicionalmente, como mínimo, tres residuos D-Arg.

15. Composición, según la reivindicación 1, en la que el marcador comprende un radionucleido.

16. Composición, según la reivindicación 8, en la que el marcador comprende un radionucleido.

17. Composición, según la reivindicación 15, en la que el radionucleido es un emisor alfa, beta o gamma.

18. Composición, según la reivindicación 15, en la que el radionucleido se selecciona del grupo que consiste en ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I y ^{211}At .

19. Composición, según la reivindicación 1, en la que el marcador es fluorescente.

20. Método *in vitro* de incorporación de un marcador en una célula, que comprende la etapa de:

poner en contacto la célula con la composición según la reivindicación 1, a través de lo cual el marcador se internaliza en la célula.

21. Método, según la reivindicación 20, en el que el marcador es fluorescente.

22. Método, según la reivindicación 20, en el que el marcador es radioactivo.

23. Método, según la reivindicación 20, que comprende además la etapa de detectar el marcador.

24. Utilización de la composición, según la reivindicación 16, en la fabricación de un medicamento para localizar células tumorales en un mamífero, y para introducir en el cuerpo de un mamífero que comprende células tumorales; de manera que el cuerpo se puede escanear con un detector de escintilación para generar una imagen que representa las células tumorales en el cuerpo del mamífero.

25. Utilización de la composición, según la reivindicación 16, en la fabricación de un medicamento de utilización en radioterapia.

26. Utilización, según la reivindicación 25, en la que el medicamento está destinado al tratamiento de un tumor.

27. Composición, según la reivindicación 1, en la que el oligopéptido comprende, como mínimo, dos residuos de aminoácidos cargados positivamente.

28. Método, según la reivindicación 20, en el que la composición comprende un oligopéptido que comprende, como mínimo, dos residuos de aminoácidos cargados positivamente.

29. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y 27, para el uso en terapia.

Figura 1

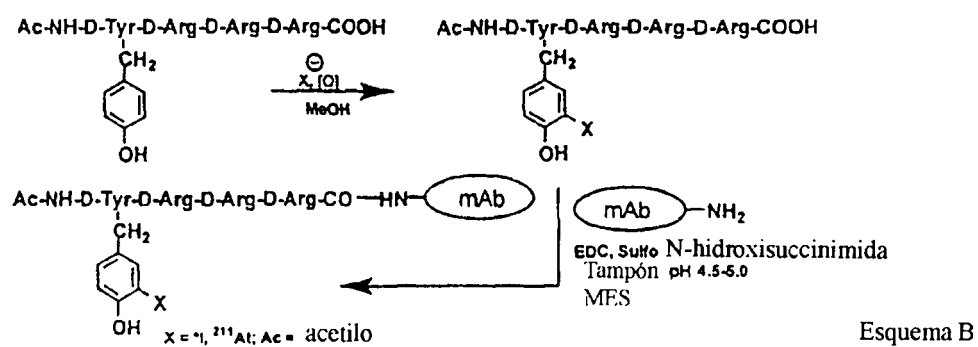
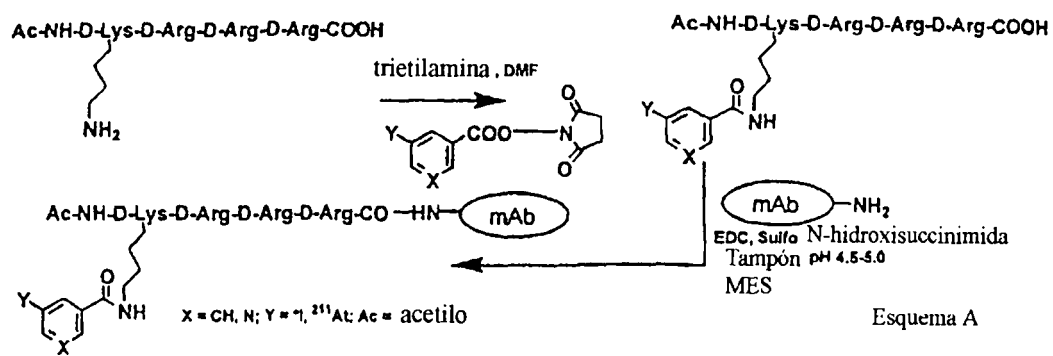


Fig. 2

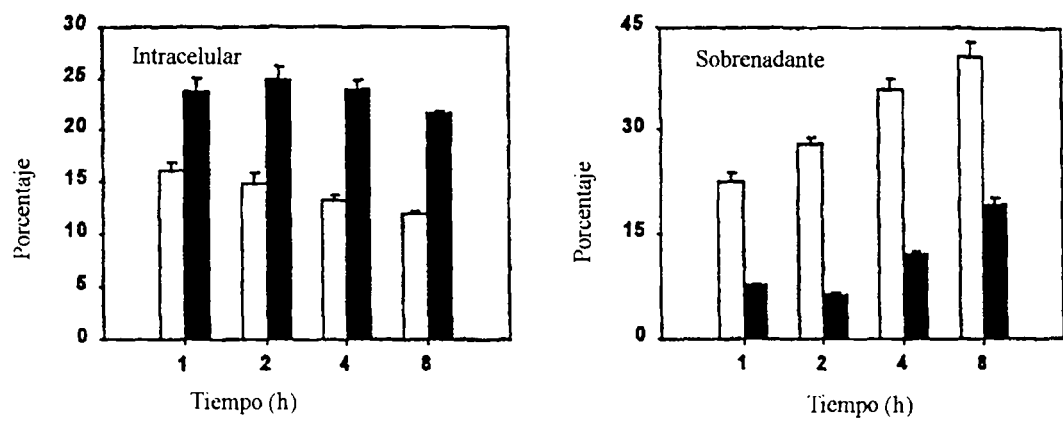


Figura 3:

Unión e Internalización in vitro

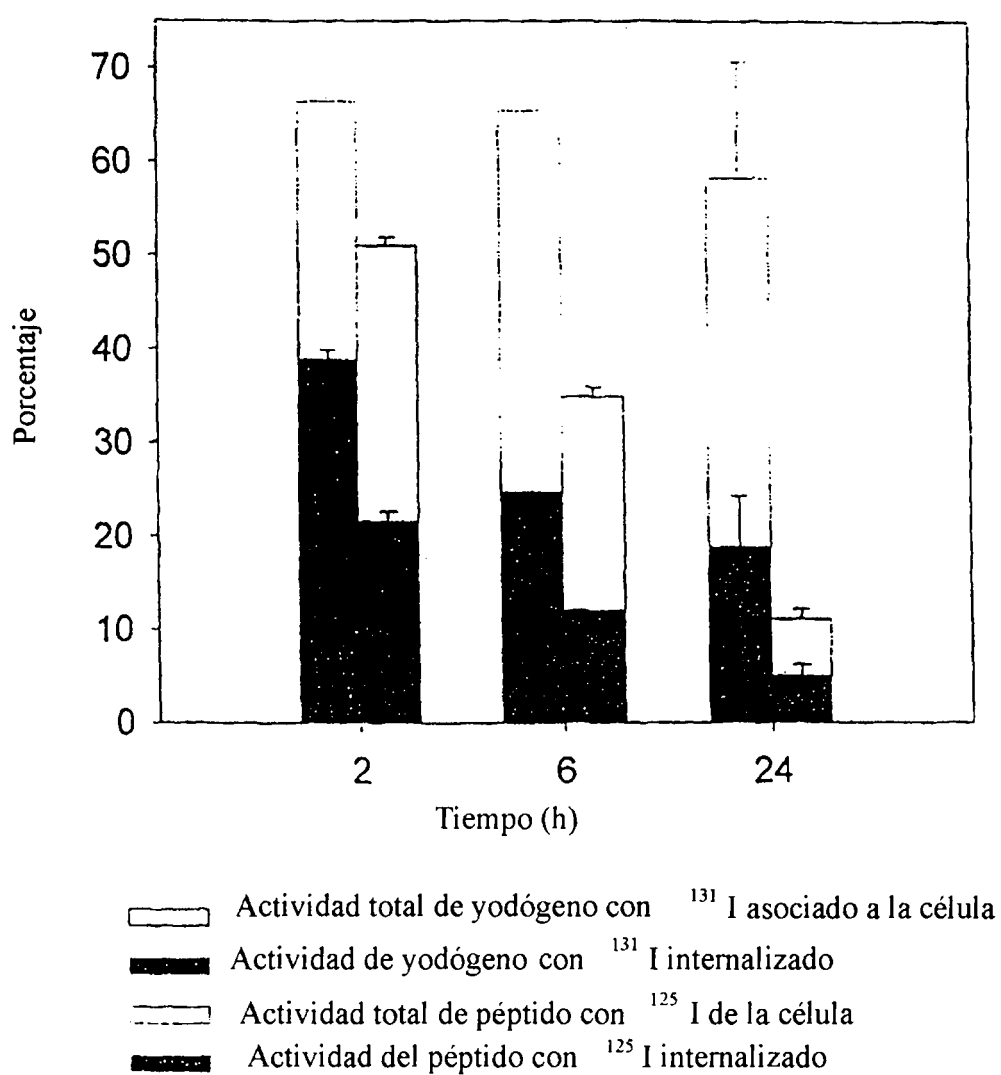


Figura 4

Captación en el tumor

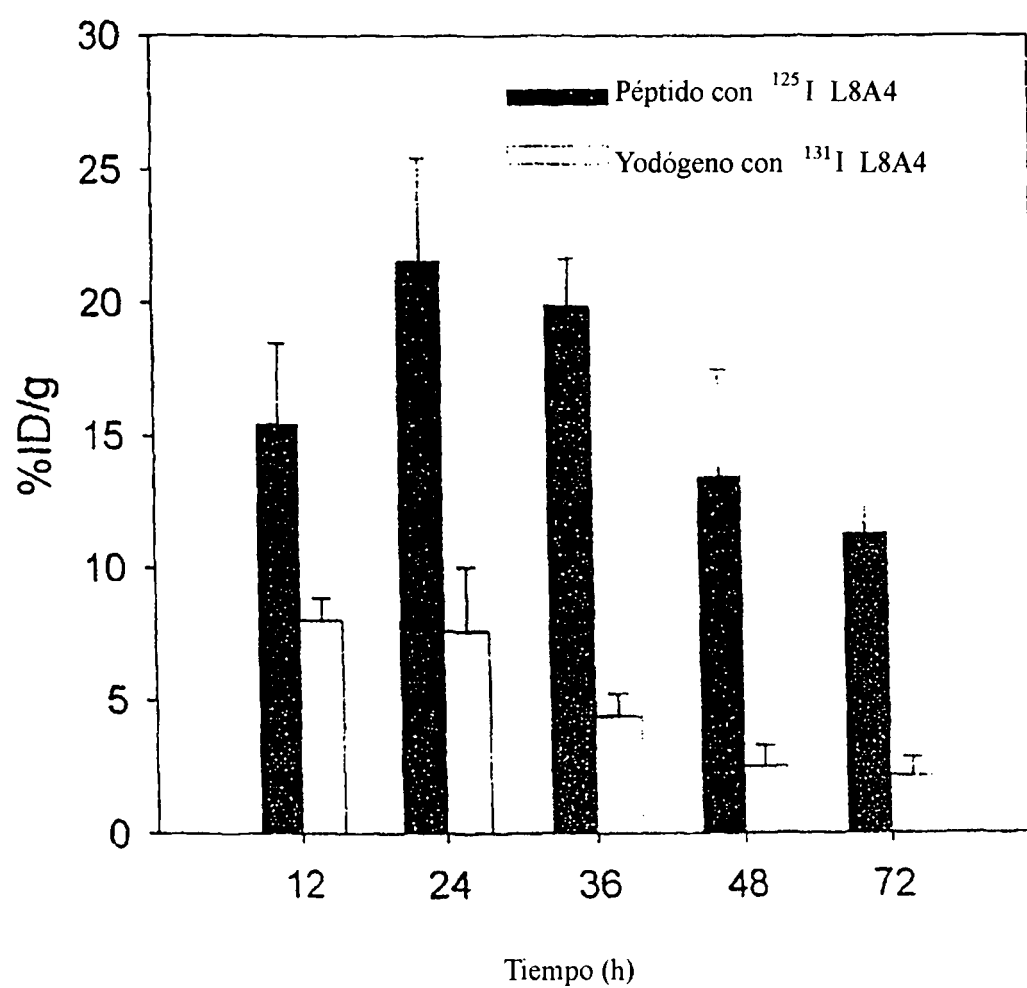


Figura 5

Captación en el tumor

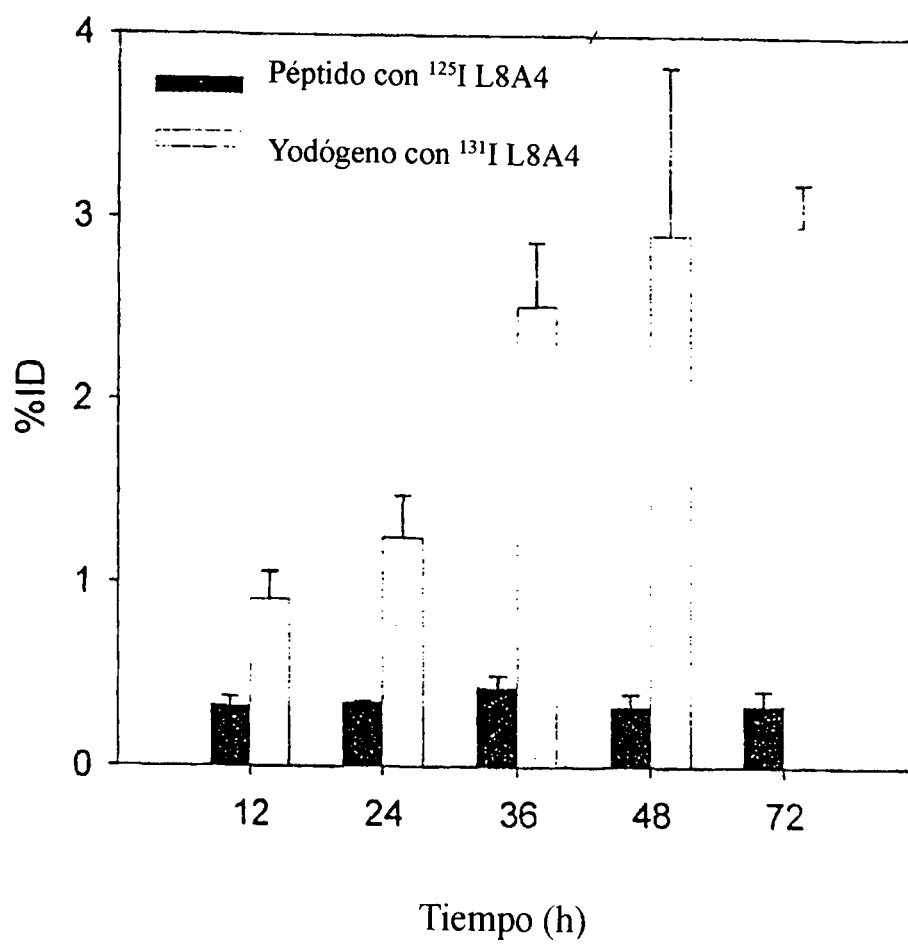


Figura 6

Proporción de la captación en el tumor
con respecto a la sangre

