



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 891**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07753630 .8**  
96 Fecha de presentación : **20.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1996716**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Anticuerpos contra el antígeno de células troncales de la próstata (PSCA) modificados genéticamente para el direccionamiento al cáncer.**

30 Prioridad: **20.03.2006 US 784192 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.08.2011**

73 Titular/es:  
**The Regents of the University of California**  
**1111 Franklin Street 12th Floor**  
**Oakland, California 94607-5200, US**

72 Inventor/es: **Wu, Anna, M. y**  
**Reiter, Robert, E.**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 363 891 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el antígeno de células troncales de la próstata (PSCA) modificados genéticamente para el direccionamiento al cáncer.

5

**Antecedentes de la invención**

El cáncer de próstata es la segunda causa principal de muertes por cáncer en hombres, con aproximadamente 27.000 muertes y 234.000 nuevos casos previstos este año en hombres de estadounidenses. El cáncer de próstata aparece en la próstata, una glándula del tamaño aproximadamente de una avellana encontrada en el sistema reproductor masculino que es responsable de la generación y almacenamiento del líquido seminal. La próstata contiene muchas pequeñas glándulas que producen aproximadamente el 20 por ciento del líquido que contiene el semen. En el cáncer de próstata, las células de estas glándulas prostáticas se transforman en células cancerosas. Debido a que la próstata rodea parte de la uretra, las enfermedades de la próstata con frecuencia afectan a la micción, la eyaculación o la defecación.

15

Debido a que el cáncer de próstata comienza cuando las células normales de la glándula prostática que segrega semen experimentan transformación en células cancerosas, el cáncer de próstata está clasificado como adenocarcinoma o cáncer glandular. La región de la glándula prostática donde el adenocarcinoma es más frecuente es la zona periférica. Inicialmente, pequeños grupos de células cancerosas quedan confinadas sino en las glándulas prostáticas normales, dando como resultado una enfermedad conocida como carcinoma *in situ* o neoplasia intraepitelial prostática (NIP). Con el paso del tiempo, estas células cancerosas comienzan a multiplicarse y difundirse al tejido prostático circundante (estroma) formando un tumor. Opcionalmente el tumor puede desarrollarse lo bastante grande como para invadir los órganos próximos tales como las vesículas seminales o el recto, o las células tumorales pueden desarrollar la capacidad para circular en el torrente sanguíneo y en el sistema linfático. El cáncer de próstata más frecuentemente se metastatiza a los huesos, los ganglios linfáticos, el recto y la vejiga.

20

25

La identificación del cáncer de próstata generalmente implica el examen digital del recto o la prueba del antígeno específico de la próstata (PSA). Durante el examen digital del recto, el sanitario profesional comprueba el tamaño, forma y textura de la próstata en las áreas que son irregulares, duras o con bulto que puedan ser indicio del cáncer de próstata. La prueba del PSA mide la concentración en la sangre del antígeno específico de la próstata, una enzima producida por la próstata. Las concentraciones de PSA inferiores a 4 ng/ml se consideran generalmente normales; las concentraciones de PSA entre 4 y 10 ng/ml indican un riesgo de cáncer de próstata superior al normal, pero el riesgo no parece aumentar en este intervalo de seis puntos. Cuando la concentración de PSA es superior a 10 ng/ml la asociación al cáncer se hace más acusada.

30

35

Mientras que la medición del ensayo del PSA en el suero ha demostrado ser una herramienta de diagnóstico muy útil, la utilidad de la prueba del PSA presenta limitaciones. Por ejemplo, la prueba del PSA no es capaz de identificar fiablemente la enfermedad en su etapa inicial. Asimismo, no existe ningún marcador disponible para predecir la aparición de la etapa metastásica por lo general mortal de la enfermedad. El diagnóstico de cáncer de próstata metastásico se consigue mediante intervención quirúrgica abierta o linfadenectomía pélvica laparoscópica, exploraciones con radionúclidos de todo el cuerpo, radiografía del esqueleto y/o análisis por biopsia de la lesión ósea. Evidentemente, es mejor la formación de imágenes y otros procedimientos de diagnóstico menos invasivos prometen facilitar la dificultad que estos procedimientos ponen sobre un paciente, así como opciones terapéuticas mejoradoras. Por consiguiente, hay necesidad de reactivos que sean capaces de identificar fiablemente la enfermedad en la etapa inicial, de predecir la sensibilidad a la metástasis y detectar con precisión los tumores para ayudar en el tratamiento, diagnóstico, pronóstico y control del cáncer de próstata. La presente invención satisface éstas y otras necesidades.

40

45

**Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona nuevos fragmentos de anticuerpo humanizado que se unen específicamente al antígeno de la superficie de las células de la próstata (PSCA) para su utilización en el diagnóstico del cáncer, para proporcionar un pronóstico de la evolución del cáncer, y para la formación de imágenes del cáncer, específicamente del cáncer de próstata, de vejiga y pancreático.

55

En una primera forma de realización, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al PSCA en la superficie de las células cancerosas. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo de la presente invención incluyen un scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpo) y un scFv-Fc, en el que el fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (VL) y de la cadena pesada variable (VH) tal como se muestra en figura 1. En aspectos de esta forma de realización, el dímero scFv puede incluir dos monómeros scFv unidos por un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen secuencias peptídicas, de las cuales, la secuencia [(GGGS)<sub>2</sub>] es un ejemplo favorable. En otros aspectos de la presente forma de realización, el fragmento de anticuerpo presenta una afinidad de K<sub>D</sub>= 2,0 nM o inferior o K<sub>D</sub>= 5,5 nM o inferior. Los fragmentos de anticuerpos convenientes para la puesta en práctica de la invención incluyen los dímeros scFv (diacuerpos) y un dímero sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpos).

60

65

En una segunda forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie de las células (a) administrando a un paciente un fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al PSCA sobre la superficie de las células cancerosas, en el que el fragmento de anticuerpo puede ser un scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH3 (minicuerpo) o un scFv-Fc, y (b) determinando si la proteína PSCA se sobreexpresa o no en el paciente utilizando formación de imágenes moleculares *in vivo*, diagnosticando de este modo el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular. En un aspecto conveniente, el fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) como se muestra en la figura 1.

En una tercera forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento de diagnóstico de un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie de las células (a) administrando a un paciente un fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al PSCA sobre la superficie de las células cancerosas, en el que el fragmento de anticuerpo puede ser un scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH3 (minicuerpo) o un scFv-Fc, y (b) determinando si la proteína PSCA se sobreexpresa o no en el paciente utilizando la formación de imágenes moleculares *in vivo*, proporcionando de este modo un pronóstico para el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular. En un aspecto conveniente, el fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) como se muestra en la figura 1.

En los aspectos de la segunda y tercera formas de realización, el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular incluye el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga y el cáncer pancreático. En aspectos adicionales de la segunda y tercera formas de realización, el fragmento humanizado está unido a un resto detectable. Ejemplos de restos detectables incluyen un radionúclido, una nanopartícula, un colorante fluorescente, un marcador fluorescente y una enzima. Ejemplos de restos detectables que son radionúclidos incluyen  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$ . Entre los procedimientos de formación de imágenes moleculares *in vivo* que pueden utilizarse en la puesta en práctica de la segunda y tercera formas de realización están MRI, SPECT, PET, y formación de imágenes moleculares en gamma-cámara planar.

Una cuarta forma de realización de la invención suministra un procedimiento para proveer un diagnóstico o pronóstico para el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular (a) poniendo en contacto una muestra biológica con un fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente a PSCA en la superficie de las células cancerosas, en el que el fragmento de anticuerpo puede ser un scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH3 (minicuerpo) y un scFv-Fc, y el fragmento de anticuerpo que comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) como se muestra en la figura 1; y (b) determinando si la proteína PSCA se sobreexpresa o no en la muestra biológica, proporcionando de este modo un diagnóstico o pronóstico para el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular.

En aspectos de la cuarta forma de realización, el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular incluye el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga y el cáncer pancreático. En otros aspectos, la muestra biológica es una biopsia de tejido o una muestra de líquido corporal, de la cual, son ejemplos la sangre, la orina o el líquido prostático. En algunos aspectos de la presente forma de realización, el fragmento de anticuerpo humanizado está unido a un resto detectable, tal como un radionúclido, una nanopartícula, un colorante fluorescente, un marcador fluorescente y una enzima.

Se describe también un procedimiento para el tratamiento o prevención de un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie de las células en un paciente (a) administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al PSCA sobre la superficie de las células cancerosas, en el que, el fragmento de anticuerpo puede ser un scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH3 (minicuerpo) o un scFv-Fc, y el fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) como se muestra en la figura 1, tratando o previniendo de este modo un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular en el paciente. En algunos aspectos de esta forma de realización, el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular incluye el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga y el cáncer pancreático.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia del ADN y la secuencia traducida de la proteína de un minicuerpo anti-PSCA humanizado. Asimismo se indican los comienzos de los siguientes segmentos de proteína: péptido señal (para secreción de mamífero), región variable de la cadena ligera (VL) procedente del anticuerpo 2B3 anti-PSCA humanizado, el péptido enlazador inter-dominio de 18 aminoácidos, la zona variable de la cadena pesada (VH) procedente del 2B3 humanizado, la secuencia del separador sintético de la IgG1 humana y la ampliación de 10 aminoácidos, y el dominio C<sub>H</sub>3 de la IgG1 seguido de dos codones de terminación.

La figura 2 ilustra el análisis SDS-PAGE del minicuerpo anti-PSCA en condiciones no reductoras (1) y reductoras (2), que presenta el dímero covalente de 95 kDa y la subunidades monoméricas de 47 kDa.

La figura 3 ilustra la HPLC de exclusión por tamaño del minicuerpo anti-PSCA que presenta pico homogéneo en el tamaño molecular esperado.

La figura 4 ilustra estudios de fijación por citometría de flujo del minicuerpo anti-PSCA. Panel 1, estirpe celular B negativa al antígeno; estirpe celular B transfectada de manera estable para expresar el PSCA, Panel 3, células cancerosas de próstata humanas LNCaP que expresan PSCA.

La figura 5 ilustra la unión del minicuerpo anti-PSCA a células positivas al antígeno por microscopia de inmunofluorescencia.

La figura 6 muestra ecografías microPET/microCT registradas conjuntamente de un ratón lampiño que lleva xenotrasplantes LAPC-9 (cáncer de próstata humano positivo a PSCA) y de PC-3 (cáncer de próstata negativo a PSCA). El ratón fue inyectado con anti-PSCA radiomarcado con I-124.

La figura 7(a) proporciona una representación esquemática de los fragmentos de anticuerpo de la invención. La figura 7(b) muestra la absorción comparativa del tumor y la actividad en la sangre de los fragmentos de anticuerpo de (a) a lo largo del tiempo.

La figura 8 (panel izquierdo) muestra una representación esquemática de un diacuerpo del PSCA humanizado de la invención y la migración del anticuerpo en forma de una proteína de ~25 kDa en SDS-PAGE. El panel derecho presenta la unión del diacuerpo a las células positivas a PSCA por FACS.

La figura 9 (panel izquierdo) muestra una representación esquemática de un minicuerpo del PSCA humanizado de la invención y la migración del minicuerpo en condiciones reducidas y no reducidas en SDS-PAGE. Se muestra también la unión del minicuerpo anti-PSCA a las células positivas al antígeno por microscopia de inmunofluorescencia. El panel derecho presenta la unión del minicuerpo a las células positiva a PSCA por FACS y un ensayo de ELISA competitivo que utiliza el minicuerpo.

La figura 10 muestra ecografías microPET/microCT registradas conjuntamente de un ratón lampiño que lleva xenotrasplantes LAPC-9 (cáncer de próstata humano positivo a PSCA) y de PC-3 (cáncer de próstata negativo a PSCA). El ratón fue inyectado con diacuerpo anti-PSCA radiomarcado con I-124 (panel izquierdo) o muestra ecografías microPET/microCT registradas conjuntamente de un ratón lampiño que lleva xenotrasplantes LAPC-9 (cáncer de próstata humano positivo a PSCA) y de PC-3 (cáncer de próstata negativo a PSCA). El ratón fue inyectado con minicuerpo anti-PSCA radiomarcado con I-124 (panel derecho).

La figura 11 (panel superior) proporciona una representación esquemática de los fragmentos de anticuerpo de la invención. La figura 11 (panel inferior) muestra ecografías microPET/microCT registradas conjuntamente de un ratón lampiño que lleva xenotrasplantes LAPC-9 (cáncer de próstata humano positivo a PSCA) y PC-3 (cáncer de próstata negativo a PSCA). El ratón fue inyectado con diacuerpo anti-PSCA radiomarcado con I-124.

La figura 12 (panel superior) muestra ecografías microPET/microCT registradas conjuntamente de un ratón lampiño que lleva xenotrasplantes LAPC-9 (cáncer de próstata humano positivo a PSCA) y PC-3 (cáncer de próstata negativo a PSCA). El ratón fue inyectado con minicuerpo anti-PSCA radiomarcado con I-124. El panel inferior es una tabla que presenta la biodistribución en 21 horas del minicuerpo y del minicuerpo desactivado en diferentes tejidos corporales de ratón.

La figura 13 (panel superior) muestra ecografías microPET/microCT registradas conjuntamente de un ratón lampiño que lleva xenotrasplantes LAPC-9 (cáncer de próstata humano positivo a PSCA) tras la inyección con anticuerpo scFv-Fc natural anti-PSCA mutante doble radiomarcado con I-124. El panel inferior muestra ecografías microPET/microCT registradas conjuntamente de un ratón lampiño que lleva xenotrasplantes LAPC-9 (cáncer de próstata humano positivo a PSCA) y PC-3 (cáncer de próstata negativo a PSCA) tras la inyección con anticuerpo scFv-Fc anti-PSCA mutante doble radiomarcado con I-124.

### Descripción detallada

La presente invención proporciona fragmentos de anticuerpo humanizado específicos para PSCA modificados genéticamente, por ejemplo, dímeros scFv (diacuerpos), dímeros sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpos), y scFv-Fc, que tienen potenciales farmacocinéticos *in vivo* y de orientación que superan las deficiencias asociadas a la utilización de los anticuerpos intactos anteriormente conocidos dirigidos contra PSCA para su utilización en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las células cancerosas que sobreexpresan el PSCA de la superficie celular, tales como las células cancerosas de próstata, de vejiga y pancreático.

### I. Introducción

El PSCA es un nuevo antígeno de la superficie de las células, anclado a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se expresa en las células normales, tales como las células de la próstata, el urotelio, los conductos renales, las células

neuroendocrinas del colon, de la placenta, las células normales de la vejiga y las células epiteliales de transición de la uretra. El gen de PSCA muestra el 30% de homología con el antígeno-2 de las células troncales (SCA-2), un miembro de la familia Thy-1/Ly-6 de los antígenos de la superficie celular anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI), y codifica una proteína de 123 aminoácidos con una secuencia señal en el terminal amino, una secuencia de anclaje al GPI con terminal carboxi y zonas de N-glicosilación múltiple.

Además de su modelo de expresión en las células normales, el PSCA es sobreexpresado tanto por células cancerosas de próstata dependientes del andrógeno como por las independientes del andrógeno, metástasis de cáncer de próstata en el hueso, carcinomas de vejiga y carcinomas pancreáticos. El PSCA se sobreexpresa ampliamente en todas las etapas del cáncer de próstata, incluyendo la neoplasia intraepitelial de próstata en alto grado (PIN). El análisis de ARNm *in situ* localiza la expresión de PSCA en el epitelio de células basales, el supuesto compartimento de células troncales de la próstata. El análisis citométrico de flujo demuestra que PSCA se expresa predominantemente en la superficie celular y está anclado mediante un enlace GPI. El análisis de hibridación fluorescente *in situ* localiza el gen en PSCA para el cromosoma 8q24.2, una región de ganancia alélica en más del 80% de los cánceres de próstata.

La expresión de PSCA observada en el cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata y cáncer de vejiga, parece correlacionarse con el grado creciente. Además, la sobreexpresión de PSCA (es decir, la expresión mayor que se encuentra en las células normales) en pacientes que padecen de cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata parece ser indicativo de escaso pronóstico. Por ejemplo, PSCA se expresa en niveles muy altos en el cáncer de próstata en relación con hiperplasia prostática benigna (HPB). Por el contrario, el marcador de cáncer de próstata PSA se expresa a altos niveles tanto en la próstata normal como en HPB, pero en niveles inferiores en la composición, haciendo inútil la expresión del PSA para distinguir el cáncer de próstata maligno de la HPB o de las glándulas normales. Debido a que la expresión del PSCA es esencialmente la inversa de la expresión del PSA, el análisis de la expresión del PSCA puede emplearse para distinguir el cáncer de próstata de las enfermedades no malignas.

Por consiguiente, el modelo de expresión del PSCA en la próstata y otros cánceres le hace una molécula atractiva para varias estrategias de diagnóstico y terapéuticas. Se han probado algunos anticuerpos intactos contra el PSCA para el diagnóstico y la terapia del cáncer de próstata. Sin embargo, la utilidad de los anticuerpos anti-PSCA intactos para el diagnóstico o el tratamiento del cáncer de próstata puede estar limitada por la capacidad restringida de moléculas de gran tamaño tales como los anticuerpos intactos para alcanzar la zona de un tumor. Como resultado las estrategias actuales que utilizan anticuerpos anti-PSCA intactos para el diagnóstico o el tratamiento del cáncer de próstata pueden estar limitadas por la eficacia del suministro de anticuerpos.

Además, los anticuerpos monoclonales terapéuticos intactos tradicionales deben almacenarse a temperaturas próximas a la de congelación para evitar la degradación. Además, los anticuerpos intactos no son apropiados para la administración oral porque se digieren rápidamente en el intestino, como tales a muchos pacientes se les administra anticuerpos intactos a modo de medios de inyección o infusión menos convenientes en una clínica. Como se aludió anteriormente, la distribución de anticuerpos intactos puede estar limitada, como tal los reactivos mayores pueden tener dificultad de penetrar más allá de la periferia de un tumor sólido o a través de una barrera sangre-cerebro, si se desean dichas distribuciones.

Para resolver los problemas de suministro y estabilidad asociados a la utilización de anticuerpos del PSCA intactos, los inventores han desarrollado una serie de fragmentos de anticuerpos humanizados específicos para el PSCA modificados genéticamente (diacuerpo (dímero scFv, 50 kDa), minicuerpo (dímero scFv-C<sub>H</sub>3, 80 kDa) y scFv-Fc, 110 kDa) que presentan características farmacocinéticas favorables *in vivo* y potencial de orientación.

Como punto de partida, se comenzó con un anticuerpo monoclonal murino, 1G8 que es específico para el PSCA, una glucoproteína de la superficie celular que se expresa en la próstata y la vejiga humanas normales. El PSCA se sobreexpresa en los cánceres de próstata (40% de los tumores primarios y 60 al 100% de las metástasis de ganglios linfáticos y médula ósea. Se expresa también en gran medida en los carcinomas de transición de la vejiga y los carcinomas pancreáticos. El anticuerpo anti-PSCA 1 G8 murino demuestra sustancial actividad anti-tumoral *in vitro* e *in vivo*. Para desarrollar este anticuerpo para uso clínico, se humanizó 1G8 por injerto de la RDC y posterior modificación molecular de la RDC para optimización, dando como resultado el anticuerpo 2B3, del que se muestra una secuencia en la figura 1.

Se observó inicialmente que el procedimiento de humanización producía una reducción cuádruple en la afinidad del anticuerpo resultante para la unión del PSCA. Por modelado de proteínas, se seleccionaron específicamente seis mutaciones de la estructura para probar un aumento de potencial en la afinidad de unión. Como resultado de este trabajo, se crearon dos diacuerpos distintos, original y madurado por afinidad, ambos con un péptido enlazador de ocho aminoácidos [(GGGS)<sub>2</sub>]. Se determinaron por Biacore las afinidades aparentes, K<sub>D</sub> = 5,41 nM y 1,89 nM, respectivamente. La cromatografía por exclusión de tamaño puso de manifiesto que los dímeros homogéneos están favorecidos por el diacuerpo original, pero no por el madurado por afinidad. Además, se examinaron longitudes de enlazador diferentes (5 frente a 8 aminoácidos) y condiciones de almacenamiento para obtener una preparación de dímero homogénea. Se demostró la unión del PSCA *in vitro* por inmunofluorescencia utilizando las estirpes de células cancerosas de próstata positivas al PSCA. Se radiyodaron los diacuerpos y los diacuerpos originales y

madurados por afinidad retuvieron 17% y 22% de inmunoreactividad, respectivamente. Un estudio de microPET con diacuerpo marcado con  $^{124}\text{I}$  demostró la localización eficaz para el tumor positivo a PSCA en ratones SCID xenoinjertados con LAPC-9. Los estudios de biodistribución con diacuerpo marcado con  $^{124}\text{I}$  demostraron una absorción del tumor de 1,22% ID/g. Mediante dichos procedimientos de modificación genética de proteínas, los inventores han optimizado parámetros tales como la afinidad de unión y la configuración para el diacuerpo 2B3.

Se han llevado a cabo estudios adicionales para determinar el formato óptico para la formación de imágenes *in vivo* radioyodando fragmentos recombinantes con  $^{124}\text{I}$  emisor de positrones ( $t_{1/2} = 4,2$  d) y evaluación con ecografía microPET. Un minicuerpo de tamaño intermedio demostró excelente absorción del tumor de 5,2 ( $\pm 1,6$ ) por ciento de dosis inyectada por gramo (% D.I./g) en xenotrasplantes de LAPC-9 que expresan a PSCA (n=12) a las 21 h después de la inyección; eliminación rápida de la sangre y de los tejidos normales produjo detección por la imagen microPET de alto contraste (figura 12). La relación de absorción del tumor positivo al tumor de referencia (PC-3) fue 2,0, y la relación tumor a cuerpo fue 4,3. El fragmento más pequeño (anticuerpo anti-PSCA) se retiró rápidamente de la circulación y solamente alcanzó 0,9 ( $\pm 0,3$ ) % D.I./g en xenotrasplantes de LAPC-9 a las 21 h (n=4) (figura 11). Un fragmento mayor de scFv-Fc, modificado genéticamente para la eliminación rápida, alcanzó 3,1 ( $\pm 0,4$ ) % D.I./g en xenotrasplantes de LAPC-9 en comparación con PC-3 (1,7  $\pm$  0,2% D.I./g) (n=4) (figura 13). Por consiguiente, tal como se describe en la presente memoria, la presente invención proporciona agentes clínicos de formación de imágenes *in vivo* ampliamente mejorados para cánceres que expresan PSCA, tales como para cánceres de próstata, de vejiga y pancreáticos, y de este modo, se extiende la utilidad de los reactivos dirigidos al PSCA más allá de la capacidad de los anticuerpos descritos anteriormente y que han sido aprobados únicamente para la terapia y el diagnóstico en muestras de tejido.

## II. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, la terminología siguiente tiene los significados atribuidos a los mismos a no ser que se indique lo contrario.

Las expresiones "antígeno de células troncales de la próstata" o "PSCA" se refieren a los ácidos nucleicos (por ejemplo, genes, pre-ARNm, ARNm), polipéptidos, variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos entre las especies que tienen una secuencia de aminoácidos que posee más de aproximadamente el 60% de identidad de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, preferentemente de aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó más de identidad de la secuencia de aminoácidos, preferentemente sobre una región de por lo menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1.000, o más aminoácidos, para un polipéptido correspondiente al PSCA como se describe en la presente memoria. Los números de registro para las secuencias de aminoácidos representativas para PSCA incluyen: CAB97347 (humano) y NP\_082492 (ratón), entre otros. Los números de registro para secuencias de ácido nucleico representativas para PSCA incluyen: NM\_005672 (humano) y NM\_028216 (ratón), entre otros.

El término "cáncer" se refiere a cánceres humanos y a carcinomas, sarcomas, adenocarcinomas, linfomas, leucemias, cánceres sólidos y linfoides, etc. Ejemplos de diferentes tipos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de hígado (es decir, hepatocarcinoma), cáncer de pleura, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer del cuello del útero, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer anal, cáncer pancreático, cáncer del conducto biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de vesícula, cáncer del recto, cáncer de apéndice, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de sistema nervioso central, cáncer de piel, coriocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de sangre, sarcoma osteogénico, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, linfoma de linfocitos B, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Burkitt, linfoma microcítico, linfoma macrocítico, leucemia monocítica, leucemia mielógena, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda y mieloma múltiple. En las formas de realización preferidas, las composiciones y procedimientos de la presente invención son útiles para diagnosticar, detectar por la imagen, proporcionar un pronóstico y el tratamiento del cáncer de próstata, vejiga o pancreático o subtipos de los mismos.

Los términos "sobrexpresión", "sobrexpresión" o "sobrexpresado" se refieren indistintamente a un gen que se transcribe o traduce a un nivel detectablemente mayor, normalmente en una célula cancerosa, en comparación con una célula normal. La sobreexpresión, por consiguiente, se refiere tanto a la sobreexpresión de la proteína del PSCA como al ARN, así como a la sobreexpresión local debida a los modelos comerciales de la proteína alterada y/o a la actividad funcional aumentada. La sobreexpresión puede detectarse utilizando técnicas convencionales para detectar la proteína (por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia Western, citometría de flujo, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, etc.) o ARNm (por ejemplo, RT-RCP, RCP, hibridación, etc). Un experto en la materia conocerá otras técnicas adecuadas para detectar la sobreexpresión de la proteína PSCA o ARNm. Las células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de próstata, vejiga o páncreas, pueden sobreexpresar PSCA en la superficie celular a un nivel de por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% en comparación a las células no cancerosas, normales correspondientes. Las células cancerosas pueden tener también por lo menos aproximadamente 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces o 7 veces el nivel superior de transcripción del PSCA o de traducción en comparación con las células normales, no cancerosas. En determinados casos, la muestra de células cancerosas es autóloga. En algunas

células, la expresión del PSCA es muy baja o indetectable. Como tal, la expresión incluye ninguna expresión, es decir, la expresión que es indetectable o insignificante.

La expresión "muestra biológica" incluye secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y autopsia, y secciones congeladas tomadas con fines histológicos. Dichas muestras incluyen sangre y fracciones o productos sanguíneos (por ejemplo, suero, plasma, plaquetas, glóbulos rojos y similares), células de esputo, tejido o cultivadas (por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas), heces, orina, otros líquidos biológicos (por ejemplo, líquido prostático, líquido gástrico, líquido intestinal, líquido renal, líquido pulmonar, líquido cerebroespinal, y similares), etc. Una muestra biológica se obtiene por lo general de un organismo eucariótico, más preferentemente de un mamífero tal como un primate, por ejemplo, chimpancé o humano; vaca; perro; gato; roedor, por ejemplo, cobaya, rata, ratón; conejo; o un ave; reptil; o pez.

Una "biopsia" se refiere al procedimiento de extraer una muestra de tejido para evaluación, para diagnóstico, pronóstico y a la propia muestra de tejido. Puede aplicarse cualquier técnica de biopsia conocida en la materia para los procedimientos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido que va a evaluarse (por ejemplo, células de próstata, riñón, vejiga, ganglios linfáticos, hígado, médula ósea, células de sangre, etc.), del tamaño y tipo del tumor (por ejemplo, sólido o en suspensión, sangre o ascitis), entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativa incluyen, pero no se limitan a, biopsia de escisión, biopsia de incisión, biopsia acicular, biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Una "biopsia de escisión" se refiere a la extracción de un masa de tumor completa con un pequeño margen de tejido normal rodeándolo. Una "biopsia de incisión" se refiere a la extracción de una cuña de tejido que incluye un diámetro en sección transversal del tumor. Un diagnóstico o pronóstico hecho por endoscopia o fluoroscopia puede requerir una "biopsia nuclear" de la masa tumoral, o una "biopsia de aspiración con aguja fina" que obtiene generalmente una suspensión de células dentro de la masa tumoral. Se expone, por ejemplo, en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Kasper, et al., editores; 16<sup>a</sup> ed., 2005, Capítulo 70 y en toda la Parte V.

Las expresiones "antígeno asociado al cáncer", "marcador específico del tumor" o "marcador del tumor" se refieren indistintamente a una molécula (por lo general proteína, carbohidrato o líquido) que se expresa preferentemente en una célula cancerosa en comparación con una célula normal y que sirve para la orientación preferida de un agente farmacológico a la célula cancerosa. Un marcador o antígeno puede expresarse en la superficie celular o en el interior de la célula. Muchas veces, un antígeno asociado al cáncer es una molécula que se sobreexpresa o está estabilizada con degradación mínima en una célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, sobreexpresión de 1 vez, sobreexpresión de 2 veces, sobreexpresión de 3 veces o más en comparación con una célula normal. Muchas veces, un antígeno asociado al cáncer es una molécula que se sintetiza de manera inapropiada en la célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene eliminaciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en la célula normal. Muchas veces, un antígeno asociado al cáncer se expresará exclusivamente en una célula cancerosa y no se sintetiza o expresa en una célula normal. Los marcadores tumorales de la superficie de la célula ilustrados incluyen las proteínas c-erbB-2 y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER) para el cáncer de mama, PSMA para el cáncer de próstata y las carbohidrato mucinas en numerosos cánceres, incluyendo los cánceres de mama, de ovario y colorrectal. Los marcadores tumorales intracelulares ilustrados incluyen, por ejemplo, las proteínas supresoras tumorales mutadas o del ciclo celular, incluyendo p53. El antígeno PSCA de la presente invención sirve como marcador de células tumorales para el cáncer de próstata, de vejiga y de páncreas.

Un "marcador", "resto detectable" o "agente de formación de imágenes" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, químicos u otros medios físicos. Un resto detectable puede estar acoplado ya sea directa o indirectamente al polipéptido PSMA o a un fragmento de péptido descrito en la presente memoria utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los restos detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos, colorantes fluorescentes (fluoresceína, isocianato de fluoresceína (FTC), verde Oregon<sup>TM</sup>, rodamina, rojo de Texas, isocianato de tetraarodimina (TRITC), Cy3, Cy5, etc.), marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), ficoeritrina, etc.), compuestos fluorescentes autoextinguidos que son activados por proteasas asociadas al tumor, enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, reactivos electrónicos densos, biotina, digoxigenina, haptenos y similares.

El término "radionúclido" se refiere a un núclido que presenta radioactividad. Un "núclido" se refiere a un tipo de átomo especificado por su número atómico, masa atómica y estado de energía, tal como carbono 14 (<sup>14</sup>C). "Radioactividad" se refiere a la radiación, incluyendo partículas alfa, partículas beta, nucleones, electrones, positrones, neutrinos y rayos gamma, emitidos por una sustancia radioactiva. Los radionúclidos adecuados para su utilización en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, flúor 18 (<sup>18</sup>F), fósforo 32 (<sup>32</sup>P), escandio 47 (<sup>47</sup>Sc), cobalto 55 (<sup>55</sup>Co), cobre 60 (<sup>60</sup>Cu), cobre 61 (<sup>61</sup>Cu), cobre 62 (<sup>62</sup>Cu), cobre 64 (<sup>64</sup>Cu), galio 66 (<sup>66</sup>Ga), cobre 67 (<sup>67</sup>Cu), galio 67 (<sup>67</sup>Ga), galio 68 (<sup>68</sup>Ga), rubidio 82 (<sup>82</sup>Rb), Ytrio 86 (<sup>86</sup>Y), Ytrio 87 (<sup>87</sup>Y), estroncio 89 (<sup>89</sup>Sr), Ytrio 90 (<sup>90</sup>Y), rodio 105 (<sup>105</sup>Rh), plata 111 (<sup>111</sup>Ag), indio 111 (<sup>111</sup>In), yodo 124 (<sup>124</sup>I), yodo 125 (<sup>125</sup>I), yodo 131 (<sup>131</sup>I), estaño 117m (<sup>117m</sup>Sn), tecnecio 99m (<sup>99m</sup>Tc), prometio 149 (<sup>149</sup>Pm), samario 153 (<sup>153</sup>Sm), holmio 166 (<sup>166</sup>Ho), lutecio 177 (<sup>177</sup>Lu), renio 186 (<sup>186</sup>Re), renio 188 (<sup>188</sup>Re), talio 201 (<sup>201</sup>Tl), astenio 211 (<sup>211</sup>At) y bismuto 212 (<sup>212</sup>Bi) tal como se utiliza en la presente memoria, la "m" en <sup>117m</sup>Sn y <sup>99m</sup>Tc representa el estado meta. Por otra parte, los elementos radioactivos

naturales tales como uranio, radio y torio, que representan por lo general mezclas de radioisótopos, son ejemplos adecuados de radionúclidos.

Tal como se describe en la presente memoria, las composiciones que comprenden un radionúclido acoplado a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce PSCA son particularmente útiles con fines terapéuticos, de formación de imágenes, de diagnóstico o de pronóstico en un paciente. El radionúclido puede acoplarse directamente al anticuerpo o fragmento específico para PSCA conjugados con un agente quelante bifuncional que contiene un radionúclido tales como  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{87}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{117}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ , y/o  $^{212}\text{Bi}$  unido a éste. Alternativamente, las composiciones de la presente invención comprenden anticuerpo específico para el PSCA o fragmentos o grupos de unión conjugado con éste que están radiomarcados con un radionúclido tales como  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  y/o  $^{131}\text{I}$ . En determinados otros casos, las composiciones para la formación de imágenes de la presente invención comprenden anticuerpo específico para PSCA o fragmentos conjugados con un agente quelante bifuncional que contiene un radionúclido tales como  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{87}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y/o  $^{201}\text{Tl}$  unido a éste. Alternativamente, las composiciones para la formación de imágenes de la presente invención comprenden fragmentos de anticuerpo específico de PSCA o grupos de unión conjugados con éste que están radiomarcados con un radionúclido tales como  $^{18}\text{F}$  y/o  $^{131}\text{I}$ . Además,  $\text{Gd}^{3+}$  puede conjugarse con los fragmentos de anticuerpo de la invención para su utilización como reactivo de contraste en aplicaciones tales como RMI.

Un "agente quelante" se refiere a un compuesto que se une a un ión metálico tal como un radionúclido, con afinidad y estabilidad considerable. Además, los agentes quelantes de la presente invención son bifuncionales, con un grupo quelante de ión metálico en un extremo y un grupo funcional reactivo que puede unirse a péptidos, polipéptidos o proteínas en el otro extremo. Los procedimientos para conjugar agentes quelantes bifuncionales a péptidos, polipéptidos o proteínas son bien conocidos en la técnica. Los agentes quelantes bifuncionales adecuados incluyen, pero no se limitan a ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), un derivado bromoacetamidobencílico de DOTA (BAD), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), ácido dietilentriaminpentaacético (DTPA), dianhídrido dicíclico del ácido dietilentriaminpentaacético (ca-DTPA), ácido 2-(p-isotiocianatobencil) dietilentriaminpentaacético (SCNBzDTPA) y ácido 2-(p-isotiocianatobencil)-5(6)-metil-dietilentriaminpentaacético (MxDTPA) (véase, por ejemplo, Ruegg *et al.*, *Cancer Res.*, 50:4221-4226 (1990); DeNardo *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 4:2483-2490 (1998)). Otros agentes quelantes incluyen EDTA, NTA, HDTA y sus análogos de fosfonato, tales como EDTP, HDTP y NTP (véase, por ejemplo, Pitt *et al.*, *INORGANIC CHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE*, Martell, Ed., American Chemical Society, Washington, D.C., 1980, págs. 279-312; Lindoy, *THE CHEMISTRY OF MACROCYCLIC LIGAND COMPLEXES*, Cambridge University Press, Cambridge, 1989; Dugas, *BIOORGANIC CHEMISTRY*, Springer-Verlag, Nueva York, 1989).

El término "nanopartícula" se refiere a una partícula microscópica cuyo tamaño se mide en nanómetros, por ejemplo, una partícula que tiene por lo menos una dimensión inferior a aproximadamente 100 nm. Las nanopartículas son particularmente útiles como restos detectables porque son lo suficientemente pequeñas para dispersar la luz visible en lugar de absorberla. Por ejemplo, las nanopartículas de oro poseen propiedades de extinción de la luz visible significativa y aparecen rojo oscuro a negro en solución. Como resultado, las composiciones que contienen anticuerpo específico para PSCA o fragmentos conjugados con nanopartículas pueden utilizarse para la formación de imágenes *in vivo* de tumores o células cancerosas en un paciente. Los procedimientos para acoplar nanopartículas de polipéptidos o de péptidos son bien conocidos en la técnica y están descritos en, por ejemplo, Liu *et al.*, *Biomacromoleculas*, 2:362-368 (2001); Tomlinson *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 303:51-60 (2005); and Tkachenko *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 303:85-99 (2005). En el extremo pequeño de este intervalo de tamaños, las nanopartículas se denominan con frecuencia agregados. Se han formado nanopartículas metálicas, dieléctricas y semiconductoras, así como las estructuras híbridas (por ejemplo, las nanopartículas con núcleo-carcasa). Las nanosferas, nanovarillas y nanotazas son precisamente unas pocas de las formas que se han desarrollado. Los puntos cuánticos semiconductores y los nanocristales son ejemplos de tipos adicionales de nanopartículas. Dichas partículas a nanoescala, cuando se conjugan con un anticuerpo específico para PSCA o un fragmento de la presente invención, pueden utilizarse como agentes para la formación de imágenes para la detección *in vivo* de tejido tumoral tales como el tejido de cáncer de próstata, de vejiga o de páncreas. Alternativamente, pueden utilizarse nanopartículas en aplicaciones terapéuticas como vehículos farmacéuticos que, cuando se conjugan con un anticuerpo específico para PSCA o un fragmento de la presente invención, liberan agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos, toxinas o cualquier otro agente citotóxico o anticanceroso conocido en la técnica a las células cancerosas que sobreexpresan PSCA en la superficie celular.

El término "recombinante", cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico natural o proteína, o que la célula procede de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que si no se expresan anormalmente, se sobreexpresan o no se expresan en absoluto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "administración" significa administración oral, administración en forma de supositorio, por contacto tópico, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intratecal,



intranasal o subcutánea o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba mini-osmótica en un sujeto. La administración se realiza por cualquier vía, incluyendo la parenteral y la transmucosal (por ejemplo, bucal, sublingual, palatal, gingival, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, la vía intravenosa, intramuscular, intrarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de administración incluyen, pero no se limitan a, la utilización de formulaciones liposómicas, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

Por "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad o dosis terapéuticamente suficiente" en la presente memoria se entiende una dosis que produce efectos terapéuticos para los que se administra. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento, y podrá ser determinada por un experto en la materia utilizando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins) y como se describe con más detalle en la presente memoria.

### III. Anticuerpos y fragmentos

El término "anticuerpo" se refiere generalmente a una molécula de inmunoglobulina inmunológicamente reactiva con un antígeno específico, e incluye anticuerpos policlonales como monoclonales. El término incluye también formas genéticamente modificadas tales como anticuerpos híbridos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El término "anticuerpo" incluye además formas de anticuerpos que se unen al antígeno, incluyendo fragmentos con capacidad de unión al antígeno producidos por cualquier medio conocido en la técnica, tales como por tratamiento por proteasa o de forma recombinante (por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv y rIgG. Véase, también, Pierce Catalog and Handbook. 1994-1995 (Pierce Chemical & Co., Rockford, Ill). Véase, también, por ejemplo, Kuby, J., *Immunology*, 3<sup>sup</sup>.rd Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York (1998). El término se refiere también a fragmentos Fv recombinantes monocatenarios (scFv). El término anticuerpo incluye además moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, minicuerpos y estructuras scFv-Fc. Véase, por ejemplo, Weiner *et al.*, (2000) *Oncogene* 19:6144; Quijcho (1993) *Nature* 362:293. Moléculas bivalentes o biespecíficas se describen en por ejemplo, Kostelny *et al.*, (1992), *J. Immunol.*, 148:1547; Pack y Pluckthun (1992), *Biochemistry*, 31:1579; Hollinger *et al.*, 1993, más arriba; Gruber *et al.*, (1994), *J. Immunol.* :5368; Zhu *et al.*, (1997), *Protein Sci.*,6:781; Hu *et al.*, (1996), *Cancer Res.*,56:3055; Adams *et al.*, (1993), *Cancer Res.*,53:4026; y McCartney *et al.*, (1995), *Protein Eng.*,8:301.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere generalmente a cualquier fragmento de un anticuerpo que tenga capacidad para unirse al antígeno. La expresión incluye estructuras que se producen de forma natural en la naturaleza tales como los fragmentos Fab y Fc que proceden del tratamiento con proteasa de anticuerpos íntegros o de estructuras de anticuerpos artificiales modificadas genéticamente que proceden de manipulaciones biológicas moleculares u otras que unen los dominios del anticuerpo en configuraciones que no se encuentran normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, configuraciones artificiales de dominios de anticuerpos pueden proceder mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica tales como por construcción de proteínas de fusión, con o sin enlazadores, tales como secuencias peptídicas, o por enlace covalente con enlazadores químicos.

La expresión "se une específicamente" significa que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une predominantemente a un antígeno o epítipo específico, tal como PSCA.

El término "Fc" se refiere generalmente a una fracción de una estructura de anticuerpo compuesta por dos cadenas pesadas que contribuye cada una a dos a tres dominios constantes, dependiendo de la clase de anticuerpo. Los especialistas expertos apreciarán que un Fc pueda generarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como por proteólisis o por procedimientos de expresión recombinante.

Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno específico puede generarse por procedimientos recombinantes tales como la selección de bancos de anticuerpos recombinantes en fago o vectores similares, véase, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989); y Vaughan *et al.*, *Nature Biotech.*, 14:309-314 (1996) o inmunizando un animal con el antígeno o con ADN que codifica el antígeno.

Por lo general, una inmunoglobulina tiene una cadena pesada y ligera. Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones se conocen también como "dominios"). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen cuatro regiones de "estructura" interrumpidas por tres regiones hipervariables, denominadas también "regiones determinantes de complementariedad" o "RDC". La extensión de las regiones marco y las RDC se han definido. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligera o pesada están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve como posición y alineación de las RDC en el espacio tridimensional.

Las RDC son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las RDC de cada cadena se

denominan por lo general RDC1, RDC2 y RDC3, numeradas sucesivamente partiendo del terminal N y están también identificadas por lo general por la cadena en la que está situada la RDC específica. Por lo tanto, una RDC3 con V<sub>H</sub> está situada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una RDC1 con V<sub>L</sub> es la RDC1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

5 Las referencias a "V<sub>H</sub>" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv o Fab. Las referencias a "V<sub>L</sub>" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina incluyendo a la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

10 La terminología "Fv monocatenario" o "scFv" se refiere a un fragmento de anticuerpo en el que los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo con dos cadenas tradicionales se han unido para formar una cadena. Por lo general, un péptido enlazador se inserta entre las dos cadenas para permitir el plegamiento apropiado y la creación de una zona de unión activa. Por lo tanto, el enlazador sirve para unir un dominio V<sub>L</sub> a un dominio V<sub>H</sub>, como se muestra, por ejemplo, en la figura 7(a).

15 Las expresiones "dímero scFv" y "diacuerpo" se refieren generalmente a un fragmento de anticuerpo que comprende un dímero formado por la interacción entre dos monómeros Fv monocatenarios como se describió anteriormente y como se ilustra, por ejemplo, en la figura 7(a).

20 Las expresiones "dímero scFv-CH3" o "minicuerpo" se refieren generalmente a un fragmento de anticuerpo que comprende un dímero formado por la unión de monómeros que comprende la estructura de scFv unido a una cadena pesada de la región constante, tal como el dominio CH3. Generalmente, se utiliza un enlazador para unir el scFv, mediante la cadena VH al dominio CH3. Dichos enlazadores pueden contener convenientemente uno o más restos de cisteína para permitir el enlace de disulfuro de los monómeros scFv-CH3 para formar un dímero scFv-CH3 o minicuerpo como se ilustra, por ejemplo, en la figura 7(a).

25 La expresión "scFv-Fc" se refiere generalmente a un fragmento de anticuerpo que comprende un dímero formado por la unión de monómeros que comprende la estructura de scFv unido a un dominio Fc del anticuerpo. Generalmente, se utiliza un enlazador para unir el scFv, mediante la cadena VH al dominio Fc. Dichos enlazadores pueden contener convenientemente uno o más restos de cisteína para permitir que el enlace de disulfuro proporcione scFv-Fc como se ilustra, por ejemplo, en la figura 2.

30 La expresión "anticuerpo híbrido" es una molécula de inmunoglobulina en la que (a) la región constante o una fracción de la misma se altera, reemplaza o intercambia de modo que el punto de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase diferente o alterada, la función del efector y/o la especie, o una molécula completamente diferente que proporciona nuevas propiedades al anticuerpo híbrido, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco y similares; o (b) la región variable, o un fragmento de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad para el antígeno diferente o alterada.

35 Un "anticuerpo humanizado" es una molécula de inmunoglobulina que contiene la secuencia mínima procedente de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región determinante de complementariedad (RDC) del receptor son restos reemplazados procedentes de una RDC de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos con marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la RDC importada o las secuencias marco. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas de las regiones RDC corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todas las regiones marco (FR) son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una fracción constante (Fc) de inmunoglobulina, por lo general la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)). La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las RDC del roedor o las secuencias de RDC por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos híbridos (patente US nº 4.816.567), en la que sustancialmente menos de un dominio variable humano íntegro se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

40 Las expresiones "epítopo" o "determinante antigénico" se refiere a un punto en un antígeno en el que se une un anticuerpo. Debe sobreentenderse que un epítopo puede ser una proteína, un carbohidrato, lípido, ácido nucleico o una entidad de molécula pequeña, si bien los epítomos de proteína son los más corrientes. En el caso de las proteínas, pueden formarse epítomos tanto a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos son retenidos por lo general en la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítomos formados

por el plegamiento terciario se pierden por lo general en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítipo por lo general incluye por lo menos 3, y más frecuentemente, por lo menos 5 u 8 a 10 aminoácidos en una configuración espacial única. Los procedimientos de determinación de la configuración espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo,

5 *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, Coligan, más arriba y Harlow & Lane, más arriba). Los anticuerpos policlonales pueden aumentarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante.

10 Por lo general, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectará en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir una proteína codificada por un ácido nucleico de las figuras o un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína conocida por ser inmunógena en el mamífero que se inmuniza. Ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero,

15 tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trealosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la materia sin experimentación impropia.

20 Los anticuerpos, alternativamente pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento con hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza por lo general con un agente inmunizante para producir linfocitos que son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Generalmente,

25 se utilizan linfocitos de la sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o esplenocitos o células de los ganglios linfáticos se utilizan si se desean fuentes de mamífero no humano. Los linfocitos se fusionan a continuación con una estirpe celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (1986)). Las estirpes celulares inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, bovino y de origen humano. Normalmente, se emplean estirpes celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT) el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

35

Pueden producirse anticuerpos humanos utilizando varias técnicas conocidas en la materia incluyendo los bancos de exposición en fagos (Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole *et al.* y Boemer *et al.*, están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pág. 77 (1985) y Boemer *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)). Asimismo, los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. En la prueba de provocación, la producción de anticuerpo humano se observa que recuerda estrechamente lo visto en seres humanos en todos los sentidos, incluyendo la reestructuración genética, montaje y repertorio de anticuerpos. Este método se describe, por ejemplo, en las patentes US nº 5.545.807; nº 5.545.806; nº 5.569.825; nº 5.625.126; nº 5.633.425; nº 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *BioTechnology*, 10:779-783 (1992); Longber *et al.*, *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996); Lonberg & Huszar, *Inter. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995).

40

45

50 En algunas formas de realización, el anticuerpo es un Fv monocatenario (scFv). Las regiones V<sub>H</sub> y la V<sub>L</sub> de un anticuerpo scFv comprenden una sola cadena que esta plegada para crear un punto de fijación al antígeno similar al que se encuentra en los anticuerpos bicatenarios. Una vez plegado las interacciones no covalentes estabilizan el anticuerpo monocatenario. Aunque las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de algunas formas de realización del anticuerpo pueden unirse directamente, un especialista apreciará que las regiones pueden estar separadas por un enlazador peptídico constituido por uno o más aminoácidos. Los enlazadores peptídicos y su utilización son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 8:5879 (1988); Bird *et al.*, *Science*, 242:4236 (1988); Glockshuber *et al.*, *Biochemistry*, 29:1362 (1990); en las patentes US nº 4.946.778, nº 5.132.405 y Stemmer *et al.*, *Biotechniques*, 14:256-265 (1993). Generalmente el enlazador peptídico no tendrá ninguna actividad biológica específica aparte de la de unir las regiones o conservar alguna mínima distancia u otra relación espacial entre la V<sub>H</sub> y la V<sub>L</sub>. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del enlazador peptídico pueden seleccionarse para influir en alguna propiedad de la molécula tal como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobia. Los anticuerpos con Fv monocatenarios (scFv) incluyen opcionalmente un enlazador peptídico de no más de 50 aminoácidos, generalmente de no más de 40 aminoácidos, preferentemente no más de 30 aminoácidos, y más preferentemente no más de 20 aminoácidos de longitud. En algunas formas de realización, el enlazador peptídico es un concatémico de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (GGGS), preferentemente 2, 3, 4, 5 ó 6 de dichas secuencias. Sin embargo, se

55

60

65

apreciará que puedan hacerse algunas sustituciones de aminoácido en el enlazador. Por ejemplo, una valina puede sustituirse por una glicina.

Se han descrito procedimientos de preparación de anticuerpos scFv. Véase, Huse *et al.*, anteriormente; Ward *et al.*, anteriormente y Vaughan *et al.*, anteriormente. En resumen, el ARNm de los linfocitos B de un animal inmunizado se aísla y se prepara ADNc. El ADNc se amplía utilizando cebadores específicos para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas. Se purifican los productos de la RCP y se unen las secuencias de ácido nucleico. Si se desea un péptido enlazador, las secuencias de ácido nucleico que codifican el péptido se insertan entre las secuencias de ácido nucleico de cadena pesada y ligera. El ácido nucleico que codifica el scFv se inserta en un vector y se expresa en la célula hospedadora apropiada. El scFv que se une específicamente al antígeno deseado se encuentra por lo general mediante el ensayo de adhesión celular sobre plástico de un banco de exposición en fagos. El ensayo de adhesión celular sobre plástico puede realizarse por alguno de entre varios procedimientos. El ensayo de adhesión celular sobre plástico puede realizarse convenientemente utilizando las células que expresan el antígeno deseado en su superficie o utilizando una superficie sólida recubierta con el antígeno deseado. Convenientemente, la superficie puede ser una perla magnética. Los fagos no unidos se desprenden de la superficie sólida y los fagos unidos se eluyen.

Los anticuerpos utilizados en la práctica de la presente invención pueden incluir anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferentemente anticuerpos humanos o humanizados que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes o que tienen especificidades de unión para dos epítopos en el mismo antígeno.

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes biespecificidades [Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza normalmente por etapas de cromatografía por afinidad. Procedimientos similares se dan a conocer en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991). Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina 5 que comprende por lo menos parte del separador sintético, las regiones CH2 y CH3. Es preferible que tenga la región constante de la primera cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en una de las fusiones por lo menos. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión independientes, y se transfectan conjuntamente en un organismo hospedador adecuado. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Los anticuerpos heteroconjugados están también comprendidos en el alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos por enlace covalente. Dichos anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para las células diana del sistema inmunitario para las células no deseadas [patente US nº 4.676.980, y para el tratamiento de la infección por el VIH [Documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química de las proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace bioéter. Ejemplos de reactivos adecuados con esta finalidad incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato y los dados a conocer, por ejemplo, en la patente US nº 4.676.980.

#### IV. Procedimientos de diagnóstico y pronóstico

En determinados aspectos, la presente invención proporciona procedimientos de diagnóstico o proporciona un pronóstico para el cáncer, por ejemplo, un cáncer que sobreexpresa PSCA tal como el cáncer de próstata, de vejiga o pancreático. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "proporcionar un pronóstico" significa proporcionar una predicción del curso probable y del desenlace clínico de un cáncer o de la probabilidad de recuperación del cáncer. En determinados casos, los pacientes de cáncer con expresión de PSCA negativa o baja presentan una supervivencia específica de la enfermedad más prolongada en comparación con aquellos con la expresión alta de PSCA. Como tal, el nivel de expresión de PSCA puede utilizarse como un indicador de pronóstico, con expresión negativa o baja como indicación de un buen pronóstico, por ejemplo, una supervivencia específica a la enfermedad más prolongada.

Los procedimientos de la presente invención pueden también ser útiles para diagnosticar la gravedad de un cáncer, por ejemplo, un cáncer que sobreexpresa PSCA. Como ejemplo no restrictivo puede utilizarse el nivel de expresión de PSCA para determinar la etapa o grado de un cáncer tal como el cáncer de próstata, por ejemplo, según el sistema de clasificación tumor/ganglios/metástasis (TNM) (International Union Against Cancer, 6ª edición, 2002) o el

sistema de estadificación de Whitmore-Jewett (American Urological Association). Por lo general, los cánceres se estadifican utilizando una combinación de examen físico, análisis de sangre y detección por la formación de imágenes médicas: si el tejido tumoral se obtiene por biopsia o intervención quirúrgica, el examen de tejido al microscopio puede también proporcionar estadificación patológica. En determinados casos, los pacientes de cáncer con expresión alta de PSCA tienen un periodo o grado más severo de este tipo de cáncer. Como tal, el nivel de expresión de PSCA puede utilizarse como indicador de diagnóstico de la gravedad de un cáncer o del riesgo de desarrollar una fase o grado más severo del cáncer. En determinados otros casos, la fase o grado de un cáncer ayuda al médico a determinar el pronóstico del cáncer y a seleccionar la terapia apropiada del cáncer.

Los procedimientos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención utilizan de manera ventajosa nuevos fragmentos de anticuerpo humanizado modificados genéticamente que se unen al PSCA de la superficie celular. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden utilizarse para determinar el nivel de expresión del PSCA en el tejido tumoral o en las células cancerosas y a continuación compararse con un valor o intervalo de referencia. Por lo general, el valor de referencia es representativo de los niveles de expresión del PSCA en una persona sana que no padece cáncer. La variación de los niveles de PSCA en el intervalo de referencia (es decir, arriba o abajo) indica que el paciente tiene cáncer o está en situación de riesgo de desarrollar un cáncer. En algunas formas de realización, el nivel de expresión del PSCA se mide tomando una muestra de sangre, orina, líquido prostático o de tejido tumoral de un paciente y midiendo la cantidad de PSCA en la muestra utilizando cualquiera de los numerosos procedimientos de detección conocidos en la técnica. Por ejemplo, un análisis desplegable puede realizarse en muestras tales como líquido de suero o prostático utilizando fragmentos de anticuerpo de PSCA descritos en la presente memoria acoplados a perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads<sup>®</sup>; Invitrogen Corp., Calsbad, CA) para determinar el nivel de expresión del PSMA.

En algunas formas de realización, la expresión del PSCA en un tejido canceroso o potencialmente canceroso puede evaluarse observando la presencia y/o localización del PSCA en un paciente. Cualquier técnica conocida en la materia de observación de tumores, tejidos u órganos en pacientes vivos puede utilizarse en los procedimientos para la formación de imágenes de la presente invención. Preferentemente, la formación de imágenes *in vivo* de tejido canceroso o potencialmente canceroso se realiza utilizando un fragmento de anticuerpo que se une a la superficie de las células que sobreexpresan PSCA, en el que el fragmento de anticuerpo del PSCA se une a un agente de formación de imágenes tal como un resto detectable (es decir, un agente de contraste). Un resto detectable puede acoplarse directa o indirectamente al fragmento de anticuerpo del PSCA descrito en la presente memoria utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Puede utilizarse una amplia variedad de restos detectables con la elección del marcador dependiendo de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación con los fragmentos de anticuerpo del PSCA, de los requisitos de estabilidad y de la instrumentación disponible y de las provisiones para la eliminación. Los restos detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos, colorante fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, isocianato de fluoresceína (FITC), verde de Oregón<sup>™</sup>, rodamina, rojo de Texas, isotiocianato de tetraarrodimina (TRITC), Cy3, Cy5, etc.), marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), ficoeritrina, etc.), compuestos fluorescentes autoextinguidos que son activados por proteasas asociadas al tumor, enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina y similares.

El resto detectable puede observarse en un paciente utilizando cualquier dispositivo o método conocido en la técnica. Por ejemplo, métodos tales como tomografía computarizada de emisión de un solo fotón (SPECT), que detecta la radiación de un radionúclido que emite un solo fotón gamma utilizando una cámara gamma de rotación y gammagrafía de radionúclidos, que obtiene una imagen o una serie de imágenes sucesivas de la distribución de un radionúclido en los tejidos, órganos o sistemas corporales utilizando una gammacámara de centelleo, pueden utilizarse para detectar la radiación emitida procedente de un resto detectable unida a un fragmento de anticuerpo del PSCA de la presente invención. La tomografía de emisión de positrones (PET) es otra técnica adecuada para detectar la radiación en un paciente para observar los tumores en pacientes vivos según los procedimientos de la presente invención. Además, la patente US nº 5.429.133 describe una sonda laparoscópica para detectar la radiación concentrada en tumores de tejido sólido. Los detectores de radiación en miniatura y flexibles destinados a uso médico son producidos por Intra-Medical LLC, Santa Mónica, California: La detección por la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o cualquier otra técnica de formación de imágenes conocida por un experto en la materia (por ejemplo, radiografía (es decir, rayos X), tomografía computarizada (TC), fluoroscopia, etc.) es también adecuada para detectar las emisiones radioactivas de radionúclidos.

Varias técnicas de formación de imágenes ópticas *in vivo* que son adecuadas para la observación de etiquetas o marcadores fluorescentes y/o enzimáticos incluyen, pero no se limitan a, microscopia de fluorescencia (véase, por ejemplo, Flusberg *et al.*, *Optics Lett.*, 30:2272-2274 (2005)), formación de imágenes de fluorescencia por fibra óptica (véase, por ejemplo, Flusberg *et al.*, *Nature Methods*, 2:941-950 (2005)), formación de imágenes de fluorescencia utilizando un explorador de punto móvil (véase, por ejemplo, Ramanujam *et al.*, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 48:1034-1041 (2001)), sistemas de formación de imágenes a base de catéter (véase, por ejemplo, Funovics *et al.*, *Radiology*, 231:659-666 (2004)), sistemas de formación de imágenes de infrarrojo próximo (véase, por ejemplo, Mahmood *et al.*, *Radiology*, 213:866-870 (1999)), tomografía molecular de fluorescencia (véase, por ejemplo, Gurfinkel *et al.*, *Dis. Markers*, 19:107-121 (2004)) y formación de imágenes bioluminiscentes (véase, por ejemplo, Dikmen *et al.*, *Turk J. Med. Sci.*, 35:65-70 (2005)).

Los fragmentos de anticuerpo del PSCA de la presente invención, cuando se conjugan con cualquiera de los restos detectables descritos anteriormente, pueden administrarse en dosis eficaces para conseguir la detección por la imagen deseada del tejido tumoral o de las células cancerosas en un paciente. Dichas dosis pueden variar extensamente, dependiendo del marcador detectable específico empleado, del tipo de tejido tumoral o de las células cancerosas sometidas al procedimiento de formación de imágenes, del equipo de formación de imágenes que se utilice y similares. Sin embargo, independientemente, de si el resto detectable o de la técnica de formación de imágenes utilizada, dicha detección tiene por objetivo determinar dónde está concentrado el fragmento de anticuerpo del PSCA en un paciente, siendo dicha concentración indicadora de la posición de un tumor o de las células tumorales. Alternativamente, dicha detección tiene por objeto determinar el alcance de la regresión del tumor en un paciente, siendo el tamaño del tumor un indicador de la eficacia de la terapia del cáncer. Por ejemplo, existen pruebas de que la expresión del PSCA puede servir como un marcador auxiliar para otros cambios en el cáncer, tales como la eliminación de PTEN o la activación de receptor del andrógeno; por lo tanto, los fragmentos de anticuerpo específicos para PSCA de la presente invención pueden utilizarse para hacer el seguimiento de una respuesta del paciente a los tratamientos que se dirigen a estas rutas.

#### V. Procedimientos de administración y diagnóstico y composiciones farmacéuticas

Tal como se describió en la presente memoria, los fragmentos de anticuerpo que se unen a PSCA en la superficie de las células tales como las células cancerosas y particularmente útiles en el tratamiento, formación de imágenes, diagnóstico y/o que proporcionan un pronóstico para cánceres tales como el cáncer de próstata, de vejiga y pancreático. Para aplicaciones terapéuticas los fragmentos de anticuerpo del PSCA de la presente invención pueden administrarse solos o administrarse conjuntamente en combinación con quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y/o inmunoterapia convencionales.

Como un ejemplo no limitativo, los fragmentos de anticuerpo del PSCA pueden administrarse conjuntamente con agentes quimioterapéuticos convencionales incluyendo los agentes alquilantes (por ejemplo, cisplatino, ciclofosfamida, carboplatino, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, azatioprina, metotrexato, fludarabina, etc.), alcaloides vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel, docetaxel, etc.), inhibidores e topoisomerasa (por ejemplo, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, plicamicina, etc.) y similares.

Los fragmentos de anticuerpo del PSCA puede administrarse también conjuntamente con agentes terapéuticos hormonales convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, esteroides (por ejemplo, dexametasona), finasterida, inhibidores de aromatasas, tamoxifeno y agonistas hormonales que liberan gonadotropina (GnRH) tal como goserelina.

Por otra parte, los fragmentos de anticuerpo del PSCA puede también administrarse conjuntamente con agentes inmunoterapéuticos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, inmunoestimulantes (por ejemplo, Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina-2, interferón alfa, etc.), anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-HER2, anti-CD52, anti-HLA-DR y anti-VEGF), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33 y calicheamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22 y exotoxina de psudomonas, etc.) y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  o  $^{131}\text{I}$ , etc.).

En una forma de realización adicional, los fragmentos de anticuerpo del PSCA pueden administrarse conjuntamente con agentes radioterapéuticos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, radionúclidos tales como  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{87}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{117}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ , y  $^{212}\text{Bi}$ , opcionalmente conjugado con los anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales.

En algunas formas de realización, las composiciones de la presente invención comprenden fragmentos de anticuerpos del PSCA y un vehículo fisiológicamente (es decir, farmacéuticamente) aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vehículo" se refiere a una sustancia típicamente inerte utilizada como diluyente o vehículo para un fármaco tal como un agente terapéutico. El término comprende también una sustancia típicamente inerte que comunica calidades cohesivas a la composición. Por lo general, los vehículos fisiológicamente aceptables están presentes en forma líquida, sólida o semisólida. Ejemplos de vehículos líquidos incluyen solución salina fisiológica, solución salina tamponada normal (NaCl 135-150 mM), agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, glucoproteínas para proporcionar estabilidad aumentada (por ejemplo, albúmina, lipoproteína, globulina, etc.) y similares. Ejemplos de vehículos sólidos o semisólidos incluyen manitol, sorbitol, xilitol, maltodextrina, lactosa, dextrosa, sacarosa, glucosa, inositol, azúcar en polvo, molasas, almidón, celulosa, celulosa microcristalina, polividona, acacia, goma guar, goma tragacanto, alginato, extracto de musgo de Irlanda, goma panward, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, Veegum<sup>®</sup>, arabogalactano de alerce, gelatina, metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ácido poliacrílico (por ejemplo, Carbopol), silicato de calcio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, caolín, cloruro sódico, polietilenglicol y combinaciones de

los mismos. Dado que los vehículos fisiológicamente aceptables se determinan en parte por la composición específica que se administra así como el procedimiento específico utilizado para administrar la composición, existen una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed., 1989).

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales, muy conocidas o pueden producirse en condiciones estériles. Las soluciones acuosas pueden envasarse para su utilización o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, estando la preparación liofilizada combinada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener  
10 sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tales como las requeridas para condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes de ajuste de pH y de tamponación, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitan y oleato de trietanolamida.

15 Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden comprender: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz de un fragmento de anticuerpo del PSCA envasado en suspensión en diluyentes, por ejemplo, agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, bolsitas o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada de un fragmento de anticuerpo del PSCA, tales como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c)  
20 suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimidos pueden incluir una o más de entre lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes de tamponación, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes, colorantes, agentes disgregadores y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas en pastilla pueden comprender un fragmento de anticuerpo del PSCA en un saborizante, por ejemplo, sacarosa, así como  
25 pastillas que contienen el polipéptido o el fragmento del péptido en una base inerte, tales como emulsiones, geles y similares de gelatina y glicerina o sacarosa y acacia, que contienen, además del polipéptido o péptido, vehículos conocidos en la materia.

30 El fragmento de anticuerpo del PSCA de elección, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede prepararse en formulaciones en aerosol (es decir, puede ser "nebulizado") para ser administrado por inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden colocarse en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

35 Las formulaciones adecuadas para administración rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que comprende una cantidad eficaz de un fragmento de anticuerpo del PSCA envasado con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas incluyen triglicéridos naturales o triglicéridos sintéticos o hidrocarburos parafínicos. Además, es posible también utilizar cápsulas de gelatina rectales que contiene una combinación del fragmento de anticuerpo del PSCA o se seleccionan con una base, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles e hidrocarburos parafínicos.

40 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por las vías intrarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea incluyen soluciones inyectables esterilizadas acuosas y no acuosas, isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen isotónica la formulación con la sangre del receptor deseado, y  
45 suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, disolventes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las soluciones y suspensiones inyectables pueden prepararse también a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. En la puesta en práctica de la presente invención, las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. La administración parenteral, la administración oral y la administración intravenosa son los procedimientos preferidos de administración. Las formulaciones de los compuestos pueden prepararse en  
50 recipientes sellados en dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas y viales.

La preparación farmacéutica está preferentemente en forma de dosis unitaria, en dicha forma la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo, por ejemplo, un fragmento  
55 de anticuerpo del PSCA. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosis unitaria puede ser una cápsula, comprimido, bolsita o la propia pastilla o puede ser el número apropiado de cualquiera de éstos en forma envasada. La composición, si se desea puede contener también otros agentes terapéuticos compatibles.

60 En la utilización terapéutica para el tratamiento del cáncer, los fragmentos de anticuerpo del PSCA utilizados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran a la dosis inicial de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg al día. Puede utilizarse un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente  
65 200 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Las dosis, sin embargo, pueden variarse dependiendo de los requisitos del paciente, de

la gravedad de la enfermedad que se está tratando, y del fragmento de anticuerpo del PSCA que se está empleando. Por ejemplo, las dosis pueden determinarse empíricamente considerando el tipo y la fase del cáncer diagnosticado en un paciente en concreto. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, sería suficiente para afectar una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. La dimensión de la dosis se determinará también por la existencia, naturaleza y alcance de cualquiera de los efectos secundarios desfavorables que acompañan a la administración de un fragmento de anticuerpo del PSCA específico en un paciente específico. La determinación de la dosis apropiada para una situación específica esta dentro de la experiencia del médico. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima del fragmento de anticuerpo del PSCA. Después, la dosis se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo en circunstancias. Por conveniencia, si se desea, la dosis diaria total puede dividirse y administrarse en fracciones durante el día.

#### VI. Kits

La presente invención proporciona también kits para realizar ensayos terapéuticos de formación de imágenes, para diagnóstico, pronóstico descritos anteriormente en la presente memoria. Los kits contendrán por lo general uno o más recipientes que contienen fragmentos de anticuerpo del PSCA que se unen al PSCA de la superficie celular, por ejemplo, en forma deshidratada, con instrucciones para la rehidratación y administración. Por ejemplo, un recipiente de un kit puede contener los fragmentos de anticuerpo del PSCA deshidratados y otro recipiente puede contener el tampón adecuado para rehidratar los componentes anhidros. Los kits pueden incluir alguno de los componentes señalados anteriormente y opcionalmente incluir además componentes adicionales tales como las instrucciones para la puesta en práctica del procedimiento deseado, anticuerpo de control, antígenos, polipéptido o péptidos tales como un anticuerpo de control negativo y un antígeno de control positivo, una armadura robótica para mezclar los componentes del kit y similares.

#### **Ejemplos**

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

#### **Ejemplo 1: Diseño y montaje genético de fragmentos de anticuerpo anti-PSCA**

Los genes 2B3 de la cadena ligera variable ( $V_L$ ) y de la cadena pesada variable ( $V_H$ ) provenían de la versión humanizada del anticuerpo 1G8 monoclonal de ratón. El injerto de la RDC se había utilizado previamente para construir el anticuerpo humanizado íntegro (Z. Gu, T. Olafsen *et al.*, 2005). Partiendo del ADN del anticuerpo 2B3 íntegro en el vector de expresión pEE12, se diseñaron cebadores para ampliar las cadenas  $V_L$ - y  $V_H$  individuales. La cadena  $V_L$  contenía en su extremo una enzima de restricción *AgeI* mientras que la cadena  $V_H$  contenía una enzima de restricción *XhoI* en su extremo del terminal C. Los dos genes se fusionaron a continuación por RCP con ampliación con solape para producir los fragmentos Fv (scFv) de cadena individual con la orientación de  $V_L$ -  $V_H$  unida por un enlazador de 18 restos de longitud, que es rico en GlySer. Después de RCP con solape, el producto se clonó dentro del vector TOPO (Stratagene) y se secuenció. La subclonación continuó en pUC18 con las enzimas de restricción *AgeI* y *EcoRI*, en las que para fusionar un péptido señal al extremo en 5' (corriente arriba) del gen  $V_L$  y del gen  $V_H$  se fusionó al dominio  $C_{H3}$  de la IgG1 humana mediante el separador sintético IgG1 humana incluyendo un enlazador peptídico GlySer de 10 restos. La secuencia final del montaje se muestra en la figura 1. Por último se clonó el minicuerpo en el vector de expresión pEE12 de mamífero (Lonza Biologicals, Slough, R.U.) utilizando las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRI*. Este vector tiene el activador de CMVh y el gen de glutamina sintetasa para selección (Bebbington *et al.*, 1992).

#### **Ejemplo 2: Expresión, selección y purificación de minicuerpos**

Se transfectaron un total de  $2 \times 10^6$  células de mieloma de ratón NSO (Galfre y Milstein, 1981) con 10  $\mu$ g de ADN de vector linealizado (cortado con *Sall*) por electroporación y se seleccionaron en medio insuficiente en glutamina tal como se describió (Yasaki, Shively *et al.*, 2001; Yasaki, Sherman *et al.*, 2004). Los clones del minicuerpo se cribaron para la expresión por ELISA, con lo que la proteína deseada fue capturada por IgG anti-humana de cabra (específica para Fc) y se detectó por IgG anti-humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (AP) (específica para Fc) (ambas de Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA). Los clones que se producen más se expandieron y se llevaron a cultivo terminal.

Los minicuerpos se purificaron en primer lugar tratando el sobrenadante del cultivo celular con AG1@-X8 al 5%, 100 a 200 mesh (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA) durante la noche para eliminar el rojo de fenol y los residuos celulares, a continuación se concentró por debajo de 100 ml y se dializó frente ácido acético 50 mM, pH 5,0. Se cargó la proteína en una columna de cromatografía de 1,6 ml de intercambio catiónico (Poros®). Se eluyeron las proteínas con gradiente de NaCl de 0-25 mM en presencia de ácido acético 50 mM, pH 5,0. Las fracciones eluidas combinadas (18 ml) que contenían el minicuerpo deseado se diluyeron hasta 100 ml con MES 50 mM, pH 6,5 y se volvieron a cargar en la columna de intercambio catiónico. Se eluyeron las proteínas con gradiente NaCl de 0 a 0,3 M en presencia de MES 50 mM, pH 6,5. El minicuerpo se dializó a continuación frente a PBS utilizando una tubuladura de membrana porosa molecular (mwco:30.000) y se concentró con un Vivaspin 20 de Vivascience



(mwco:30.000).

### Ejemplo 3: Caracterización de fragmentos de anticuerpo

5 El tamaño y la composición de las de las proteínas purificadas se analizaron por SDS-PAGE (figura 2) en condiciones no reductoras y reductoras (DTT 1 mM). Se determinó el tamaño de la estructura natural por columnas de exclusión de tamaño (Superdex 75) (Farmacia) (figura 3).

10 Para examinar las características estructurales del minicuerpo 2B3, se realizó la SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. El minicuerpo migró con un P.M. de ~47 kDa en condiciones reductoras y de ~95 kDa en condiciones no reductoras (figura 2). La actividad de unión por citometría de flujo y tinción inmunofluorescente (figura 4 y 5) en dos tipos de células distintos demostró que el minicuerpo reconoce el PSCA celular. La afinidad aparente del minicuerpo con respecto a su contrapartida del anticuerpo íntegro y el anticuerpo monoclonal de ratón original (1G8) se determinó por ELISA de competición. La afinidad relativa de 1G8 se midió resultando 5 mM, el anticuerpo 15 2B3 humanizado era 25 nM, mientras que el minicuerpo fue de 47 mM. Por lo tanto el formato de plegamiento de la proteína monocatenaria del minicuerpo ha resultado ser 9,2 veces menor en su afinidad relativa que el anticuerpo murino relativamente ~ 2 veces menor en la afinidad que el anticuerpo 2B3 intacto.

20 La afinidad de unión relativa de PSCA para los minicuerpos se determinó por ELISA de competición en el que los pocillos de la placa de microvaloración se recubrieron con PSCA-Fc purificado (Z Gu, T. Olafsen *et al.*, 2006).

25 Se realizó la citometría de flujo para evaluar la actividad de unión del PSCA celular (figura 4). Se utilizaron una estirpe celular de linfoma de linfocitos B transfectada con EBV que expresa el PSCA exógeno y una estirpe celular estable LN-CaP transfectada con PSCA. En resumen, se incubaron  $5 \times 10^5$  células durante 30 minutos en hielo con 100  $\mu$ l de minicuerpo a una concentración de 2  $\mu$ g/ml. Se lavaron las células y se tiñeron con anticuerpo conjugado con Alexa 488 anti-hFc de cabra a la dilución de 1:500.

30 Para los estudios de inmunofluorescencia, se cultivaron células LNCaP en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poly-L-lisina. Se trataron las células en un modo no permeabilizado tal como se describe en (Z. Gu 2000). Se añadió minicuerpo a razón de 2 mg/ml en PBS/BSA al 1% durante 60 minutos y se lavó dos veces con PBS/BSA al 1%. Se añadió IgG anti-humana de cabra conjugada con Alexa488 (dilución 1:500) (Molecular Probes, Eugene Oregon) durante 30 minutos y se lavó tres veces con PBS. Se montaron los portaobjetos en Vectashield (Vector Laboratory, Inc., Burlingame, CA, USA) y se detectó por la imagen utilizando un microscopio fluorescente Axioskop 2 (Zeiss) (figura 5).

35 Para la radioyodación y la formación de imágenes microPET, se radioyodó el minicuerpo purificado con el isótopo  $^{124}\text{I}$  emisor de positrones (yoduro sódico en NaOH 0,02 M; pureza del radionúclido >99%) proporcionado por V.G. Khlopin Radium Institute & RITVERC GmbH (San Petesburgo, Rusia) tal como se describió anteriormente (Kenanova, Olafsen *et al.*, 2005). Se ensayó la inmunoradioactividad incubando el minicuerpo radioyodado con una cantidad en exceso de células SKW-PSCA+ durante una hora y centrifugando las células para recuento.

### Ejemplo 4: Formación de imágenes microPET de xenotransplantes utilizando el diacuerpo anti-PSCA con $^{124}\text{I}$

45 Para evaluar la orientación al tumor del minicuerpo con  $^{124}\text{I}$ , se crearon xenotransplantes positivo al antígeno (carcinoma de próstata LAPC-9) o negativo al antígeno (carcinoma de próstata PC-3) por inoculación subcutánea en 8 ratones SC.I.D Se realizaron estudios de formación de imágenes microPET en animales con tumores positivos a PSCA de 488 mg de promedio (intervalo de 64 a 1,236 mg) y 574 mg. Se inyectaron los ratones con una dosis media de 118,24  $\mu$ Ci de minicuerpo precursor con  $^{124}\text{I}$  y se obtuvieron exploraciones de PET en todo el cuerpo comenzando a las 4 y acabando a las 21 h después de la administración. Las imágenes microPET a las 21 h (figura 6) demuestran la absorción en el tumor positivo (LAPC-9) y baja actividad en el tumor de referencia (PC-3) así como en otros órganos vitales. Después de las exploraciones puntuales a las 21 h, se sacrificaron los animales, y se cuantificó la actividad en varios tejidos utilizando un contador gamma. Los resultados confirman la absorción en el modelo LAPC-9 con una absorción media ( $m = 8$ ) de 4,65% D.I./g (intervalo 2,14 a 7,6% D.I./g). La absorción por xenotransplantes de PC-3 de referencia y las actividades en el hígado y bazo fueron significativamente menores que la absorción en los tumores positivos. A las 21 h el minicuerpo estaba todavía en circulación, indicado por la actividad en la sangre de 3,80% D.I./g de promedio.

### Ejemplo 5: Formación de imágenes microPET adicional de xenotransplantes que utilizan el diacuerpo anti-PSCA con $^{124}\text{I}$

60 Se generaron fragmentos de anticuerpo humanizados modificados genéticamente específicos para PSCA adicionales [diacuerpo (dímero scFv, 50 kDa) minicuerpo (dímero scFv-CH3, 80 kDa) y scFv-Fc, 110 kDa], que difieren en su farmacocinética *in vivo* y en la potencial orientación. Los fragmentos recombinantes se radioyodaron con el  $^{124}\text{I}$  emisor de positrones ( $t_{1/2} = 4,2$  d) y se evaluaron por exploración microPET para determinar el formato 65 óptimo para la formación de imágenes *in vivo*. Como se muestra en la figura 12, el microcuerpo de tamaño intermedio demostró una excelente absorción del tumor de 5,2 ( $\pm 1,6$ ) por ciento de la dosis inyectada por gramo (%).

D.l./g) en xenotransplantes LAPC-9 que expresan PSCA (n = 12) a las 21 h después de la inyección; la eliminación rápida de la sangre y los tejidos normales produjeron imágenes microPET de alto contraste. La relación de absorción de tumor positivo a tumor de referencia (PC-3) fue 2,0, y la relación de tumor a cuerpo fue 4,3.

- 5 Tal como se muestra en la figura 11, el fragmento más pequeño (diacuerpo anti-PSCA) se eliminó rápidamente de la circulación y solamente alcanzó 0,9 ( $\pm 0,3\%$  D.l./g) en xenotransplantes LAPC-9 a las 21 h (n = 4). Un fragmento de scFv-Fc mayor, modificado genéticamente para la eliminación rápida, alcanzó 3,1 ( $\pm 0,4\%$ ) D.l./g en xenotransplantes LAPC-9 en comparación con PC-3 (1,7  $\pm 0,2\%$  D.l./g) (n = 4) (figura 13).
- 10 Debe entenderse que los ejemplos y las formas de realización descritas en la presente memoria se proporcionan únicamente a título ilustrativo y que los expertos en la materia sugerirán varias modificaciones o cambios teniendo en cuenta los mismos.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al antígeno de las células troncales de la próstata (PSCA) en la superficie de las células cancerosas, en el que dicho fragmento se selecciona de entre el grupo constituido por scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpo) y scFv-Fc, y en el que dicho fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) y de la cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) representadas en la figura 1.
- 10 2. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, en el que dicho dímero scFv comprende dos monómeros scFv unidos por un enlazador.
- 15 3. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 2, en el que dicho enlazador comprende una secuencia peptídica.
- 20 4. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 3, en el que dicha secuencia peptídica comprende la secuencia [(GGGS)<sub>2</sub>].
5. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de anticuerpo presenta una afinidad de K<sub>D</sub> = 5,5 nM o inferior, preferentemente K<sub>D</sub> = 2,0 nM o inferior.
- 25 6. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de anticuerpo es un dímero scFv (diacuerpo), o un dímero sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpo).
7. Fragmento de anticuerpo humanizado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su utilización en el tratamiento o la prevención de un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular en un paciente.
- 30 8. Fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al PSCA en la superficie de las células cancerosas, en el que dicho fragmento se selecciona de entre el grupo constituido por scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpo) y scFv-Fc para su utilización en un procedimiento de diagnóstico de un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- (a) administrar dicho fragmento de anticuerpo humanizado a un paciente; y
- 35 (b) determinar si la proteína PSCA se sobreexpresa o no en el paciente utilizando la formación de imágenes moleculares *in vivo*, diagnosticando de este modo el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular,
- en la que dicho fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) y cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) representadas en la figura 1.
- 40 9. Fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al PSCA en la superficie de las células cancerosas, en el que dicho fragmento se selecciona de entre el grupo constituido por scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpo) y scFv-Fc para su utilización en un procedimiento de pronóstico de un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- 45 (a) administrar dicho fragmento de anticuerpo humanizado a un paciente; y
- (b) determinar si la proteína PSCA se sobreexpresa o no en el paciente utilizando la formación de imágenes moleculares *in vivo*, pronosticando de este modo el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular,
- 50 en la que dicho fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) y cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) como se muestra en la figura 1.
- 55 10. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 8 ó 9, en el que la formación de imágenes moleculares *in vivo* se selecciona de entre el grupo constituido por detección por formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía computarizada de emisión de un fotón único (SPECT), tomografía de emisión de positrones (PET) y formación de imágenes en gamma-cámara planar.
- 60 11. Procedimiento *in vitro* para proporcionar un diagnóstico o pronóstico de un cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:
- (a) poner en contacto una muestra biológica con un fragmento de anticuerpo humanizado que se une específicamente al PSCA en la superficie de las células cancerosas, en el que dicho fragmento se selecciona de entre el grupo constituido por scFv, un dímero scFv (diacuerpo), un dímero sc-Fv-CH<sub>3</sub> (minicuerpo) y scFv-Fc, en el que dicho fragmento de anticuerpo comprende las secuencias de las regiones de la cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) y cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) representadas en la figura 1; y
- 65

(b) determinar si la proteína PSCA se sobreexpresa o no en la muestra biológica, proporcionando así un diagnóstico o pronóstico del cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular.

5 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la muestra biológica es una biopsia de tejido o una muestra de líquido corporal, preferentemente sangre, orina o líquido prostático.

10 13. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 8 ó 9 o procedimiento según la reivindicación 11, en el que el fragmento de anticuerpo humanizado está unido a un resto detectable, seleccionándose preferentemente de entre el grupo constituido por un radionúclido, una nanopartícula, un colorante fluorescente, un marcador fluorescente y una enzima.

14. Fragmento de anticuerpo humanizado según la reivindicación 8 ó 9 o procedimiento según la reivindicación 11, en el que el cáncer que sobreexpresa el PSCA de la superficie celular se selecciona de entre el grupo constituido por cáncer de próstata, cáncer de vejiga y cáncer pancreático.

Fig. 1 (hoja 1)

tctagagccgccaccatggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctctgggtt  
 S R A A T M E T D T L L L W V L L L W V

*péptido señal*

ccaggtccaccgggtgacattcagctgacccaatctccaagctcttgtccgcctctgtg  
 P G S T G D I Q L T Q S P S S L S A S V

VL

gggatagggtcaccatcacctgcagtgccagttcaagtgaagttaagattcattcactgggtac  
 G D R V T I T C S A S S V R F I H W Y  
 cagcagaaccaggaaagctccaaaagactcatctatgacacatccaaactggcttct  
 Q Q K P G K A P K R L I Y D T S K L A S  
 ggcgtcccttctaggtcagtggtccgggtctgggacagacttcaccctcaccatttagc  
 G V P S R F S G S G T D F T L T I S  
 agtctgcagccggaagatttcgccacctattactgtcagcagtgagtagtagccattc  
 S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W S S S P F  
 acgttcggacaggggaccaaggtggagataaaaggcagtagcggggtgggtccgga  
 T F G Q G T K V E I K G S T S G G S G

Fig. 1 (hoja 2)

enlazador  
 ggggctcggagggtggcggcagctcagaggttcagctggtggagctctgggggtggcctt  
 G G S G G G S S E V Q L V E S G G L  
 VH  
 gtgcagcggggctcactccgtttgtcctgcgcagcttctggcttcaacattaaagac  
 V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D  
 tactatacactgggtgcgtcagggcccctggttaagggcctggaatgggttgcattgatt  
 Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V A W I  
 gatcctgagaatggtgacactgaatttgtcccgaagttccagggccgtgccactataagc  
 D P E N G D T E F V P K F Q G R A T I S  
 gcagacatccaaaacacagcctacctgcagatgaacagcctgcgtgctgaggacact  
 A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T  
 gccgtctatttataaacgggggttctggggtcaaggaaaccctggtcaccgtctcg  
 A V Y Y C K T G G F W G Q G T L V T V S  
 agcgagcccaaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtcggcgaggtagctct  
 S E P K S C D K T H T C P P C G G S S

Fig. 1 (hoja 3)

separador sintético	ampliación
ggcggatccggcggcagcccgagaccacaggtgtacaccctgccccatccggg	
G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R	
CH3	
gatgagtgaccaagaaccagggtcagcctgacctggtcaaggcttctatccagc	
D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S	
gacatcgccgtggagtgggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccgcct	
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P	
cccgctggactccgacggctccttctctacagcaagctcacctggacaagagc	
P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S	
aggtggcaggggaacgtcttctcatgctccgtccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac	
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H	
tacacgagaagaccctcctgtctccgggtaaatgatag	
Y T Q K S L S L S P G K - -	

Fig. 2

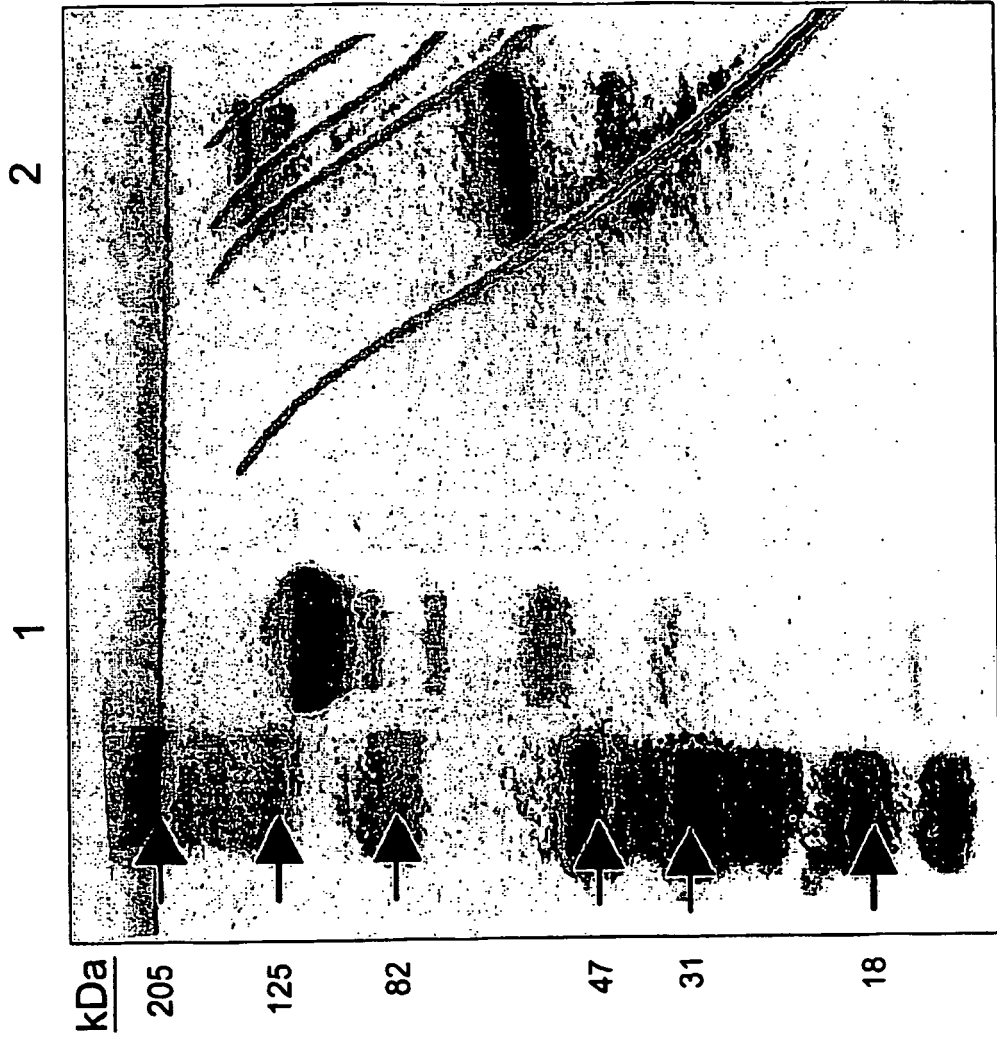




Fig. 3

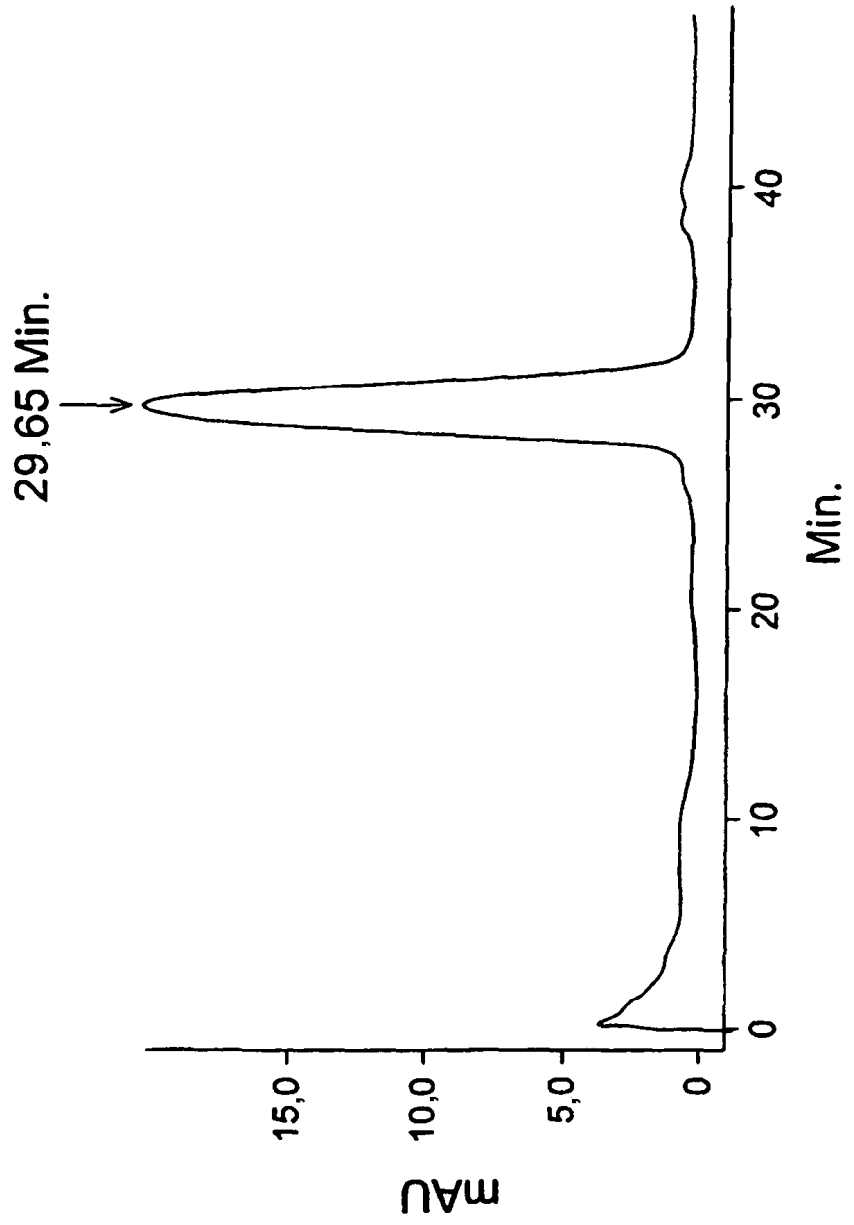


Fig. 4a

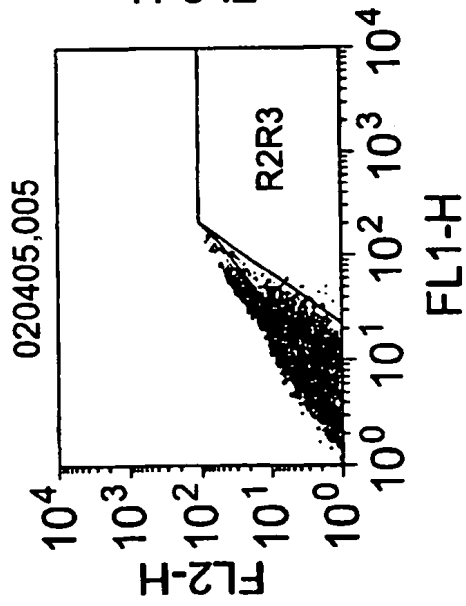


Fig. 4b

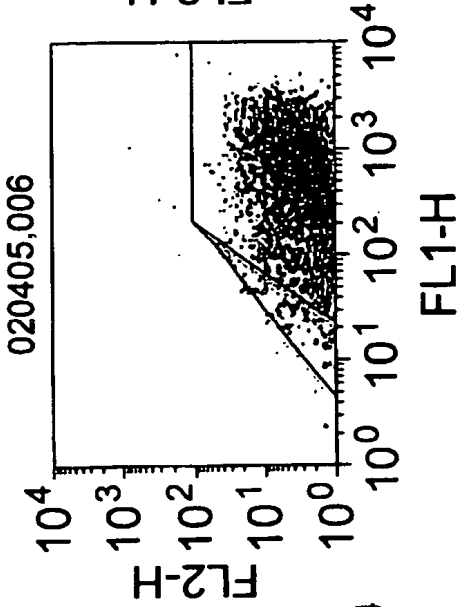
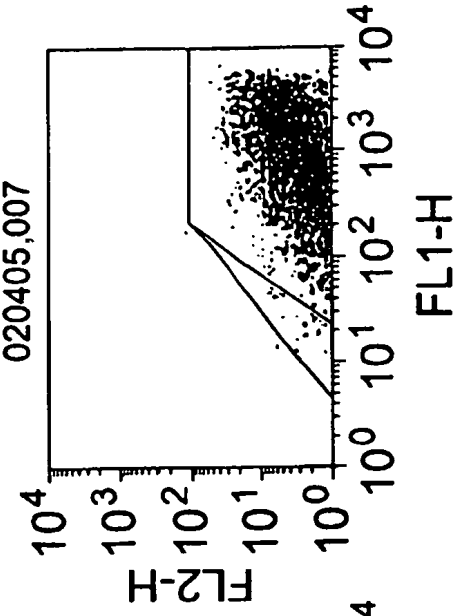
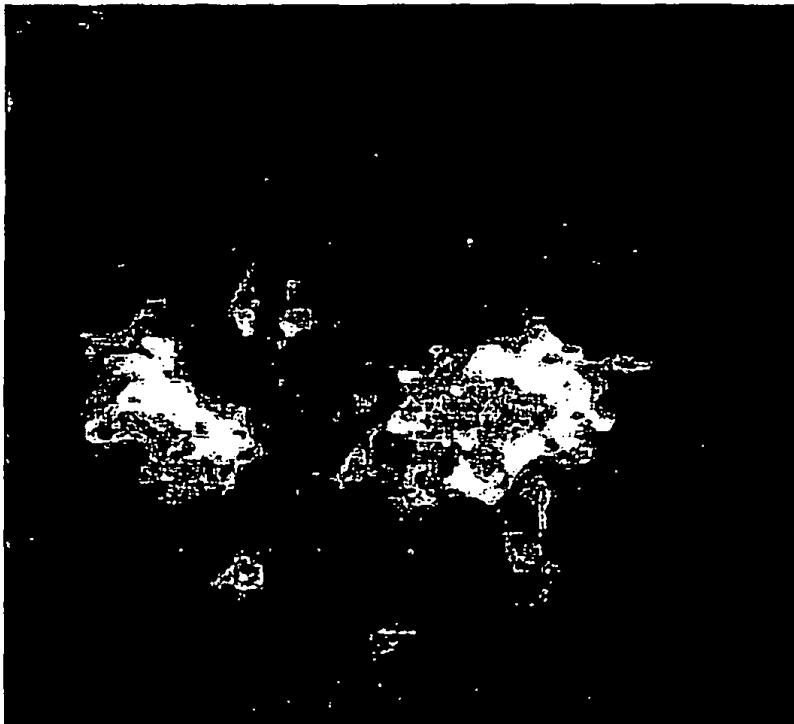
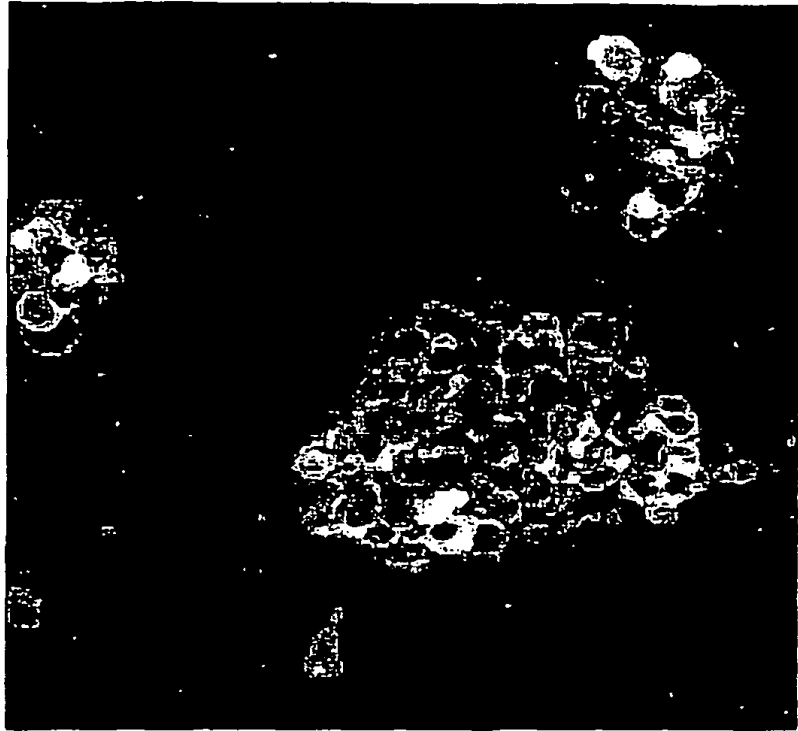
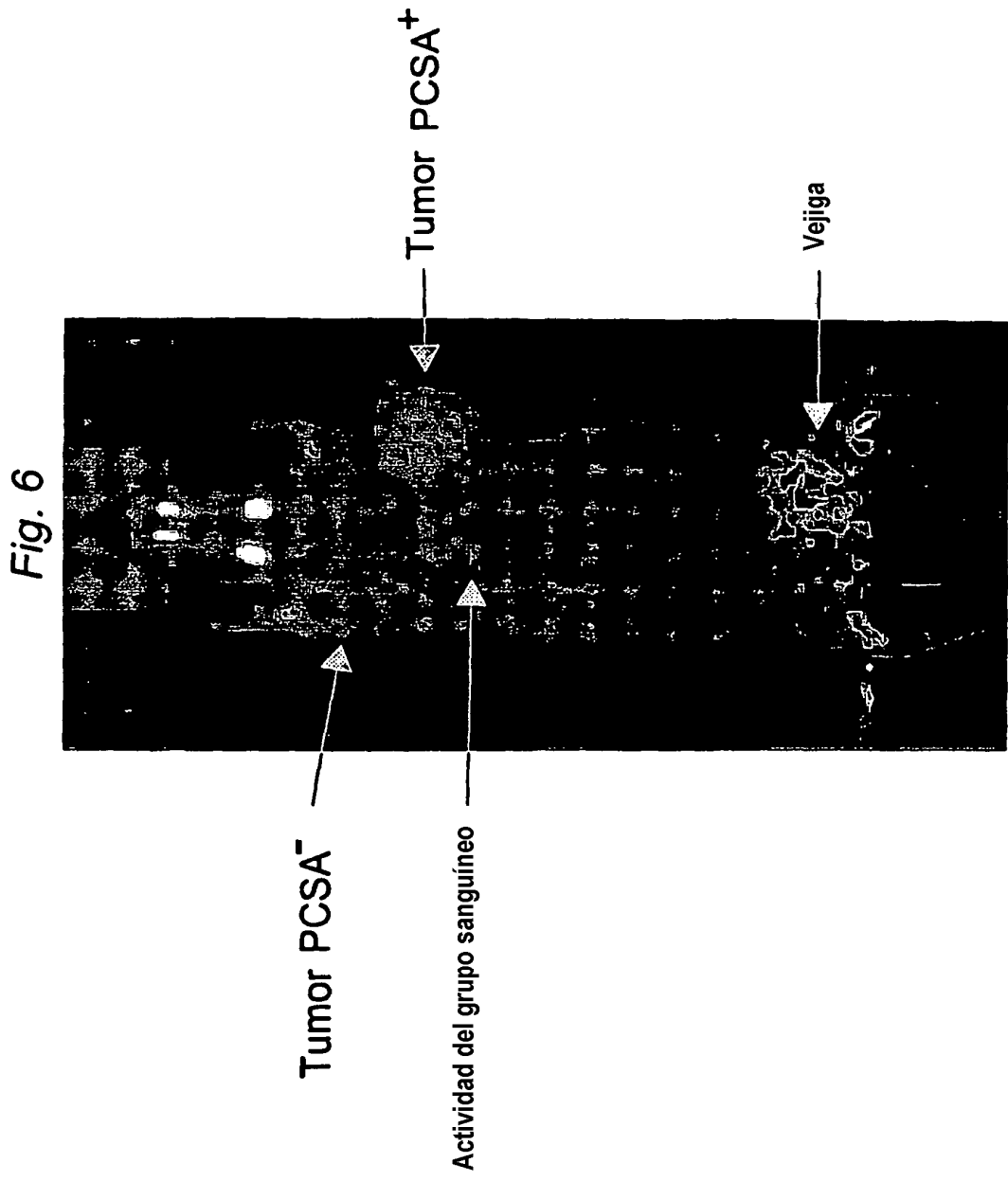


Fig. 4c



*Fig. 5*





**Fig. 7a**  
**Modificación genética de fragmentos de anticuerpo para controlar PK**

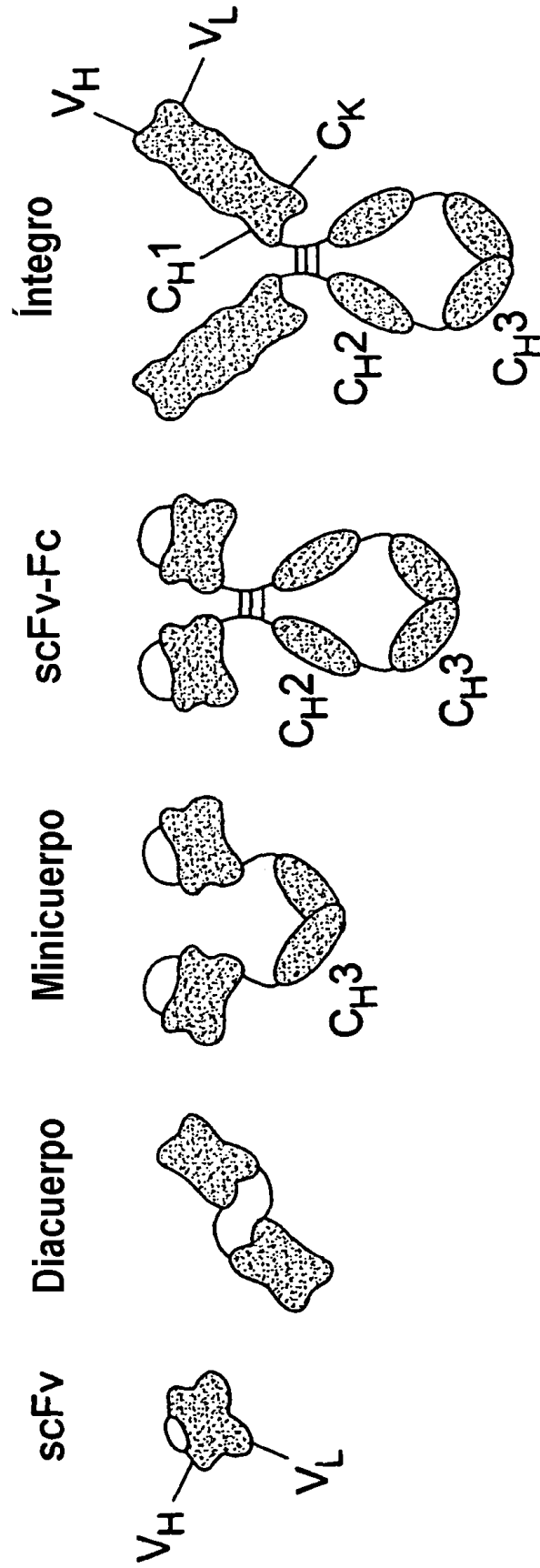
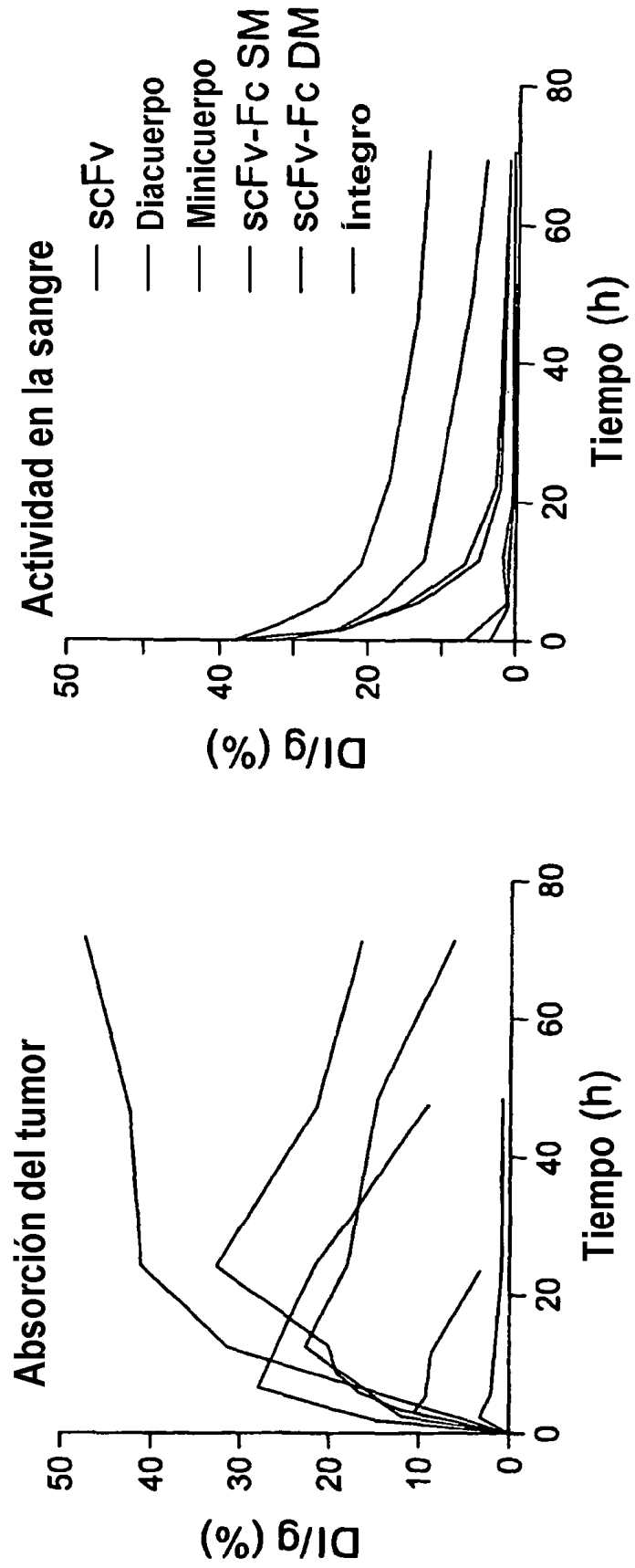
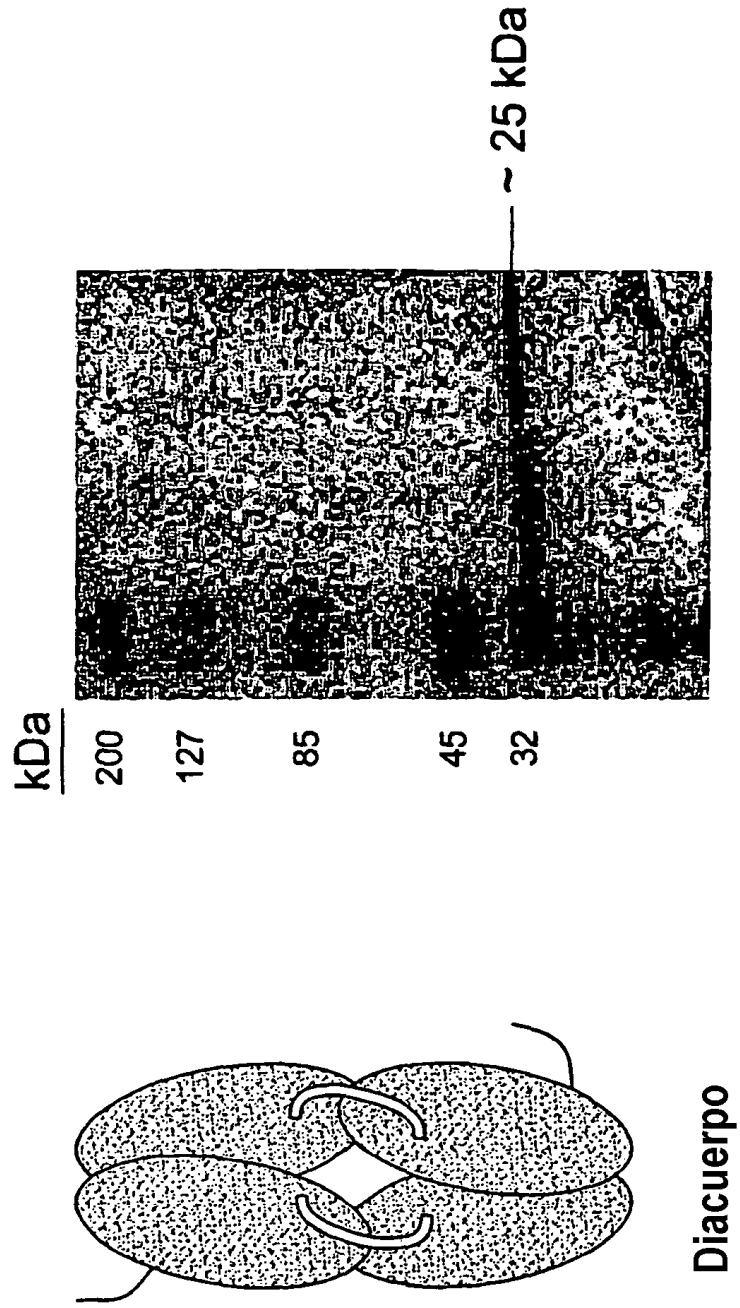


Fig. 7b

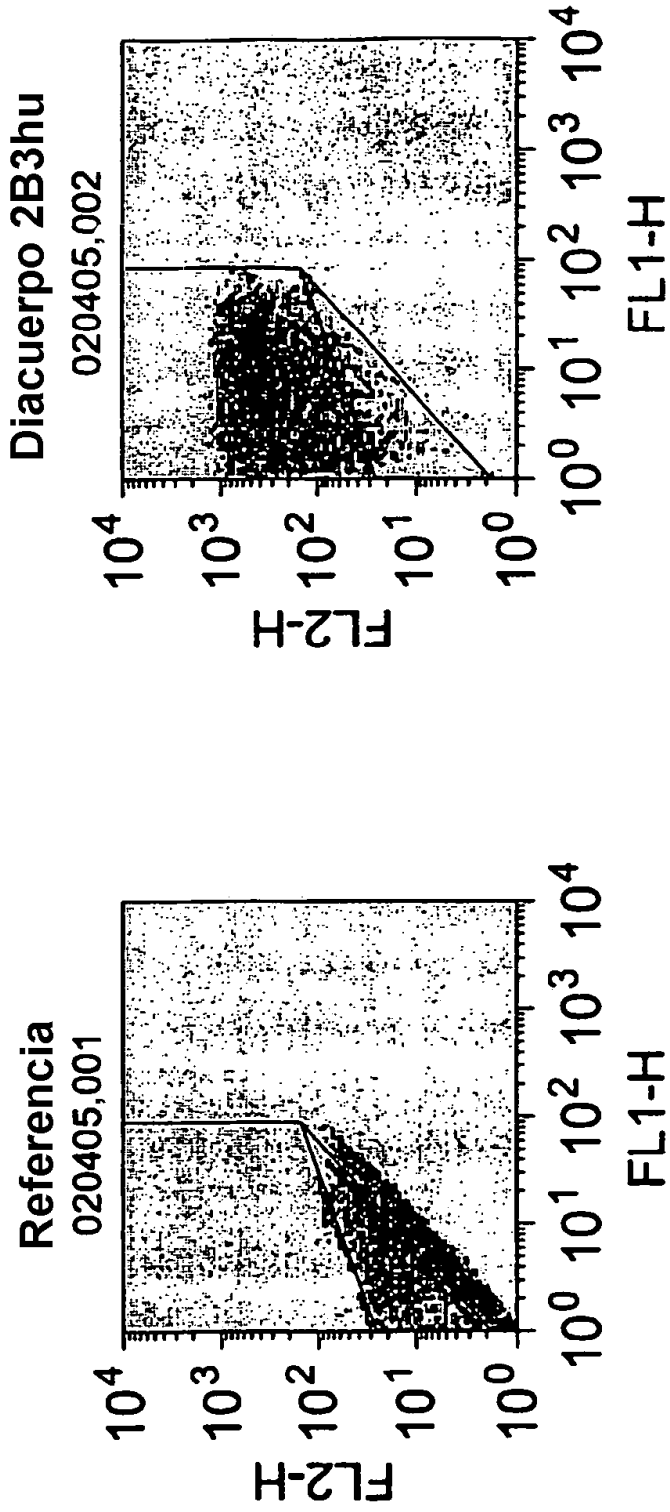


**Fig. 8 (hoja 1)**  
**Diacuerpos Anti-PSCA humanizados:**  
**Expresión y caracterización**



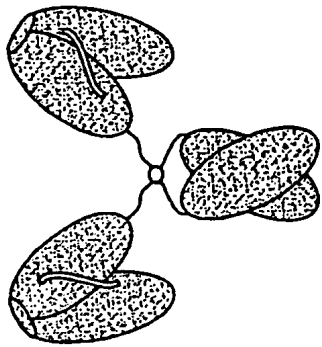
**Fig. 8 (hoja 2)**

**Unión de diacuerpo 2B3hu a células positivas a PSCA por citometría de flujo**

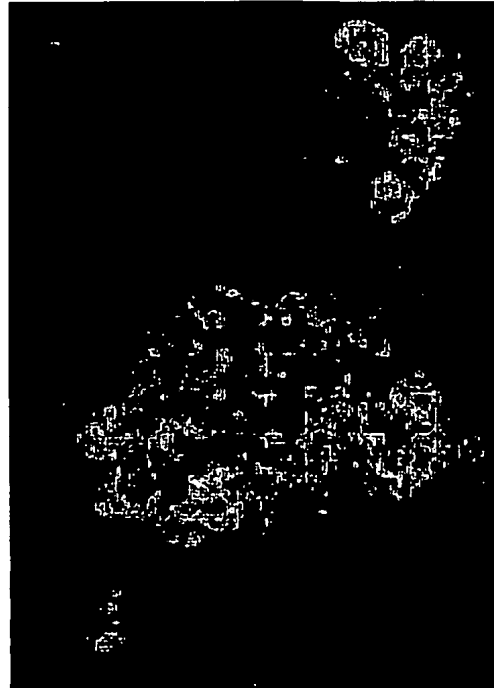




*Fig. 9 (hoja 1)*

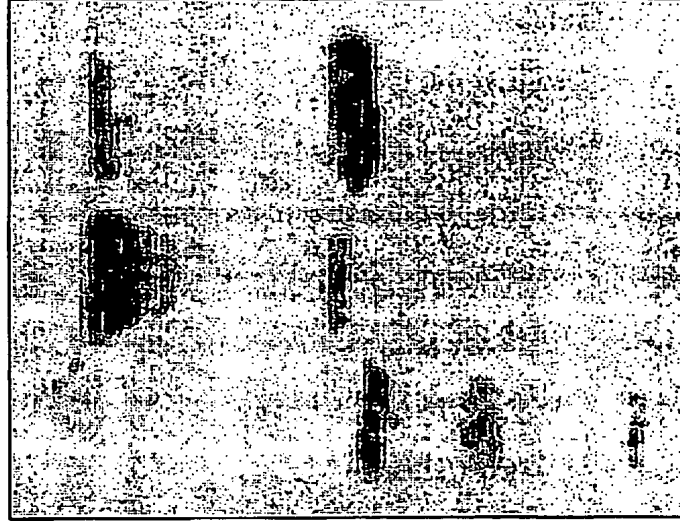


**Minicuerpo**



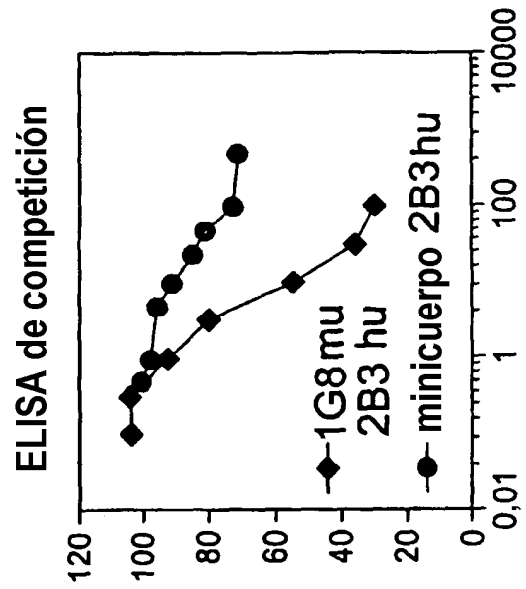
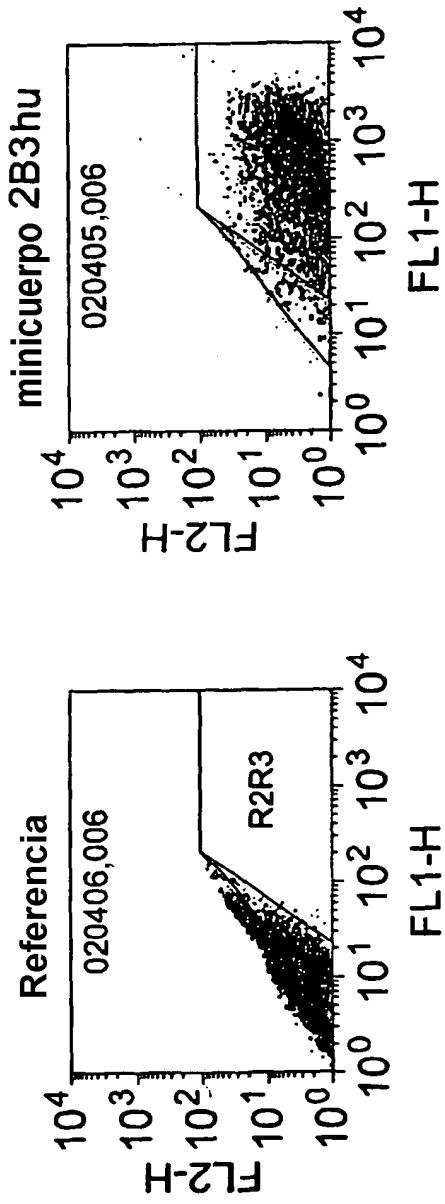
**Inmonofluorescencia  
de minicuerpos**

**Tinción Coomassie**



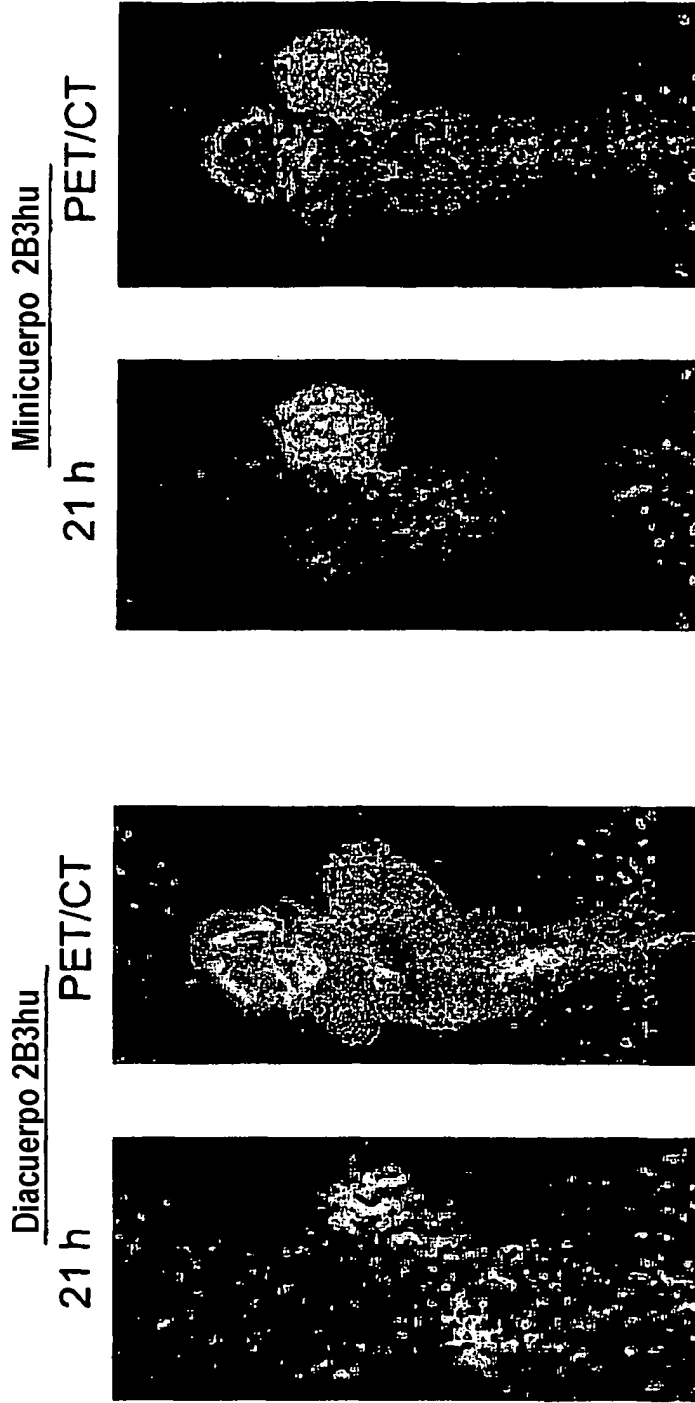
**Reducida frente a no reducida**

Fig. 9 (hoja 2)



**Fig. 10**

M **Detección por la imagen microPET utilizando  $^{212}\text{Po}$ SCA**  
 diacuero y minicuero anti-PSCA 2B3hu con I-124



Diacuero 2B3hu

LAPC-9 = 0,7 (0,2)% DI/g

PC-3 = 0,3 (0,2)% DI/g

Tumor: tumor negativo = 2,06

Minicuero 2B3hu

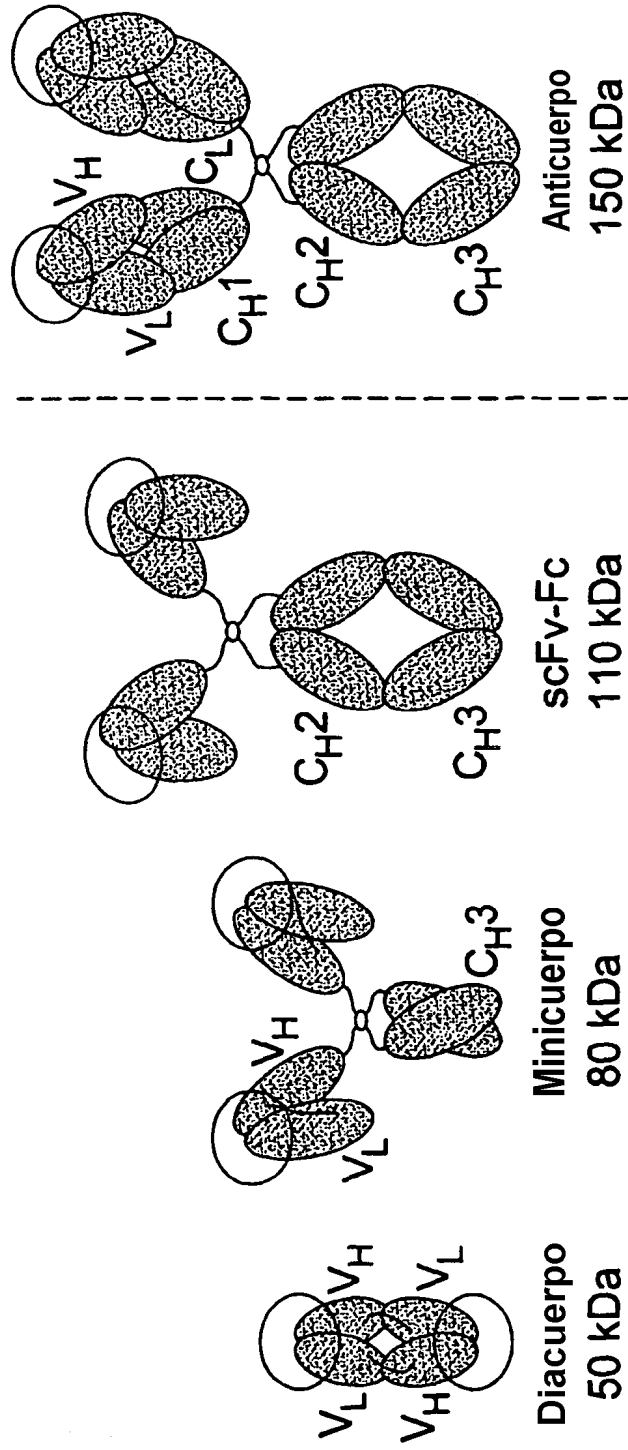
LAPC-9 = 5,5 (0,7)% DI/g

PC-3 = 2,7 (0,3)% DI/g

Tumor: tumor negativo = 2,04

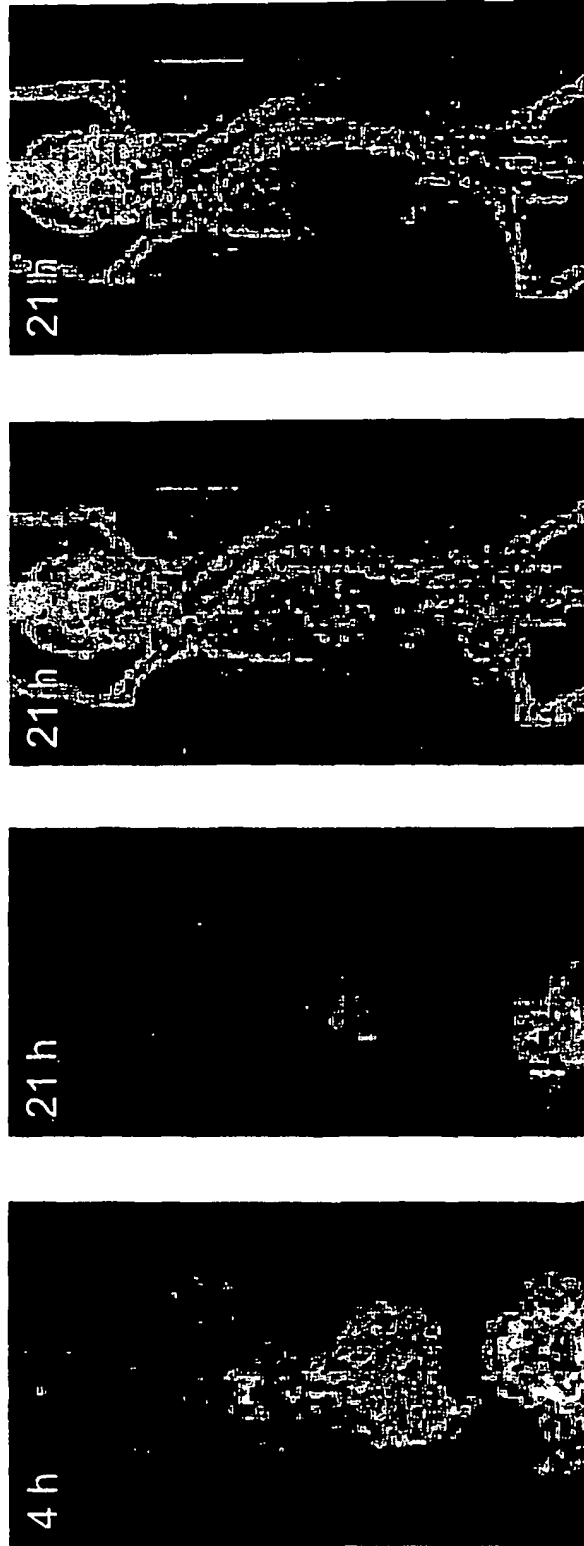
**Fig. 11 (hoja 1)**

**Fragmentos de Anticuerpo**



Tamaño

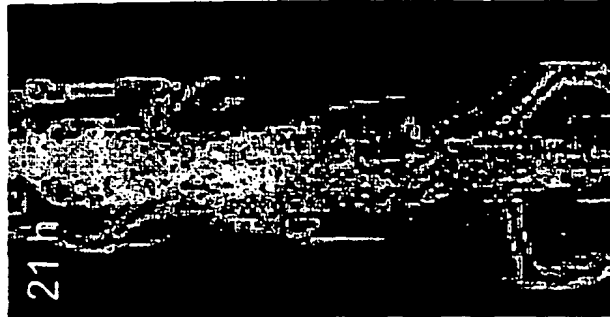
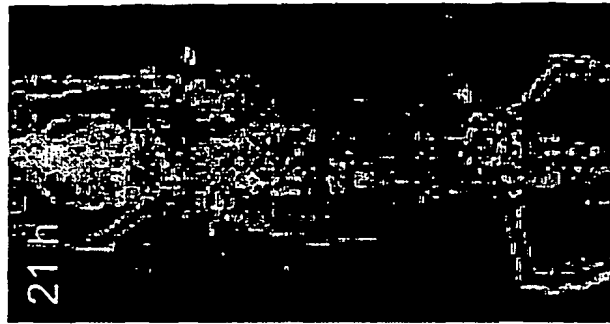
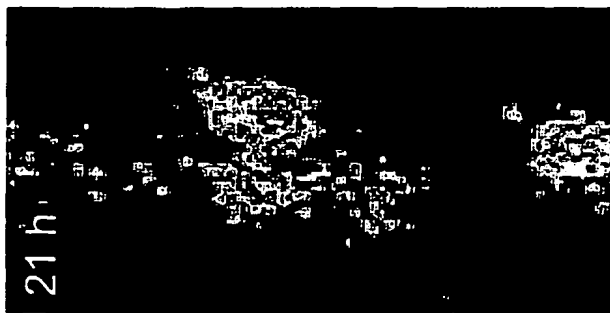
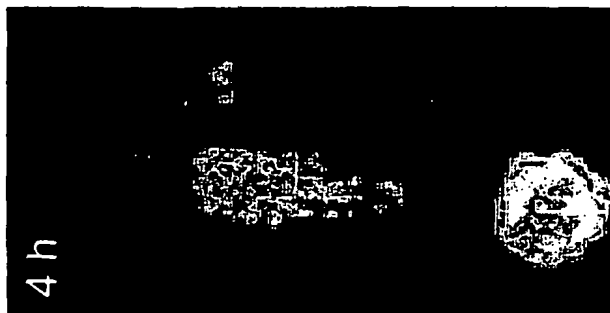
**Fig. 11 (hoja 2)**  
 Diacuerpo anti-PSCA: Detección por la  
 imagen microPET con I-124



	Recuento en tejido	%DI/g a la	21 h (n = 4)
○ 90% de eficacia en marcado	LAPC-9	0,9 (± 0,3)	
○ 42% de inmunorreactividad	PC-3	0,5 (± 0,3)	
○ Proyecciones coronarias	Sangre	0,6 (± 0,2)	

*Fig. 12 (hoja 1)*

Minicuerpo anti-PSCA: Detección por la imagen microPET con I-124



- 84% de eficiencia de marcado
- 34% de inmunorreactividad
- Proyecciones coronarias

Fig. 12 (hoja 2)

## Biodistribución a las 21 h de I-124

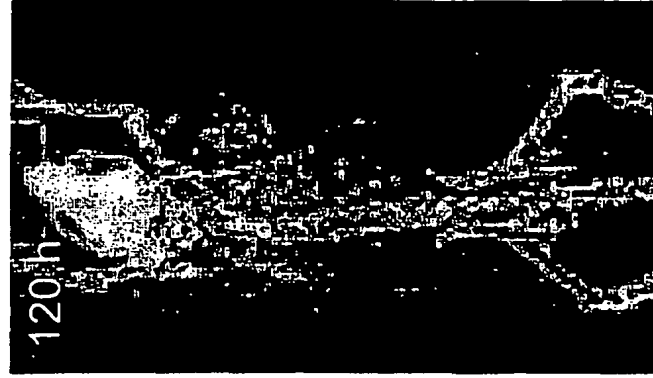
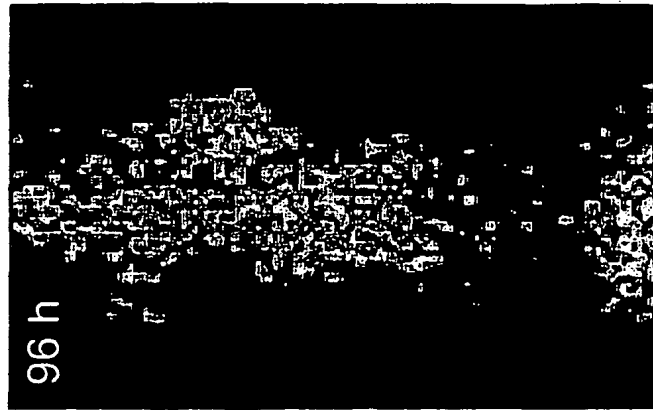
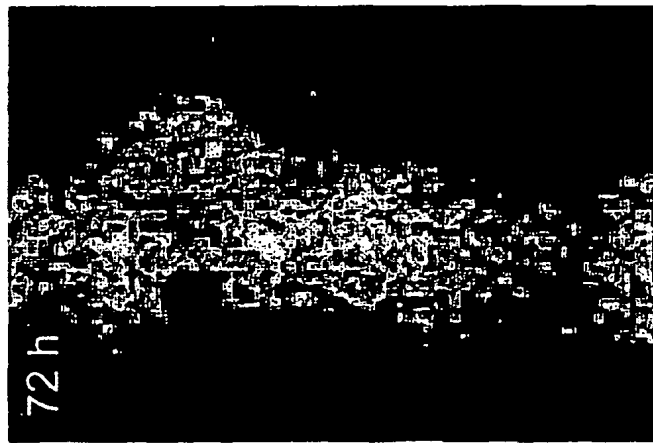
Órgano	Minicuerpo n = 12	Minicuerpo desactivado n = 12
	%ID/g	%ID/g
LAPC-9 (+)	5,2 (±1,6)	1,5 (±0,6)
PC-3 (-) n = 4	2,6 (±0,2)	--
Hígado	1,3 (±0,3)	1,0 (±0,2)
Bazo	1,5 (±0,5)	0,9 (±0,3)
Riñón	1,9 (±0,5)	1,5 (±0,3)
Pulmón	3,4 (±1,0)	2,1 (±0,4)
Sangre	4,9 (±1,3)	4,4 (±0,5)
Cuerpo	1,2 (±0,1)	--

3,5

2,0

**Fig. 13 (hoja 1)**

**Detección por la imagen microPET de scFv  
-Fc anti-PSCA (WT, eliminación lenta)**



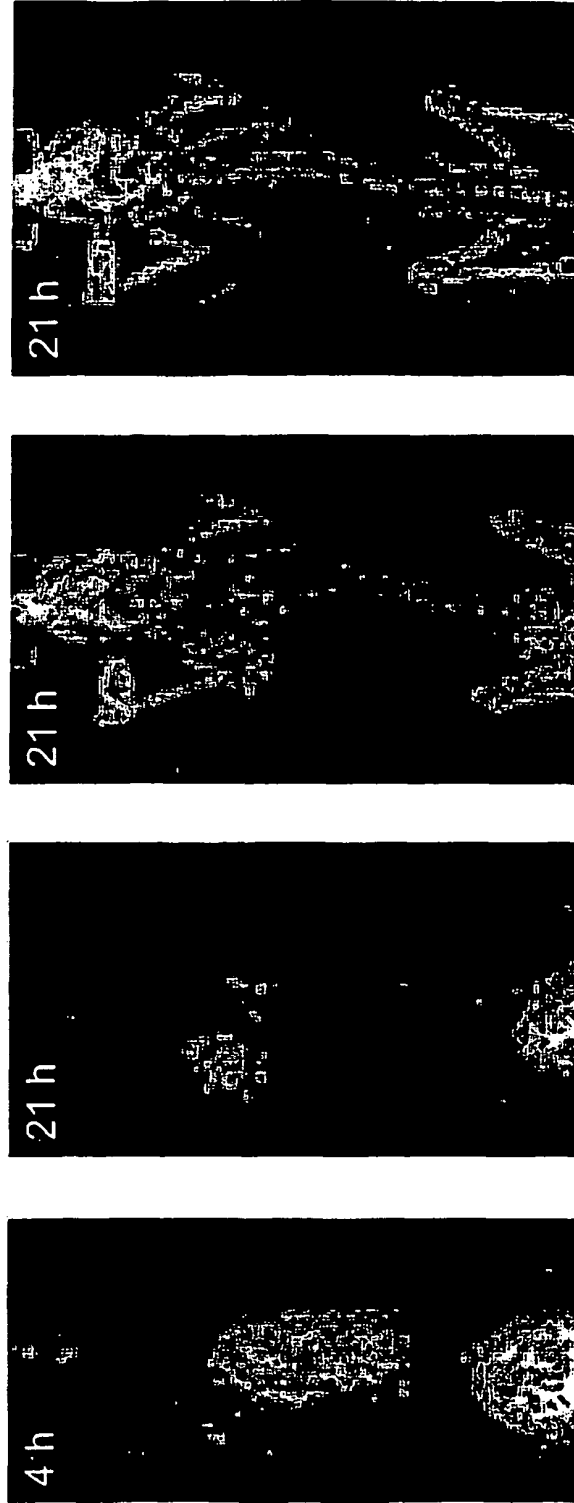
- 83% de eficacia en marcado
- 27% de inmunorreactividad
- Proyecciones coronarias

Recuento en tejido	%DI/g a las 120 h (n = 4)
LAPC-9	3,5 (± 0,9)
Sangre	5,0 (± 0,6)



**Fig. 13 (hoja 2)**

**Detección por la imagen microPET de scFv-Fc anti-PSCA (mutante doble, eliminación rápida)**



○ 82% de eficacia en marcado	Recuento en tejido	%DI/g a las 21 h (n = 4)
○ 25% de inmunorreactividad	LAPC-9	3,1 (± 0,4)
○ Proyecciones coronarias	PC-3	1,7 (± 0,2)
	Sangre	5,3 (± 0,5)
	Cuerpo	1,1 (± 0,1)