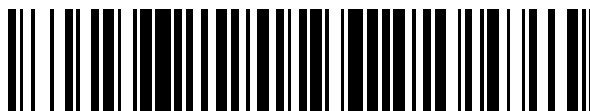


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 515**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2014 PCT/GB2014/053420**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075445**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2014 E 14814696 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3071595**

54 Título: **Anticuerpo anti-calicreína-2 humanizado**

30 Prioridad:

19.11.2013 GB 201320408

05.02.2014 GB 201401973

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

25.10.2019

73 Titular/es:

FREDAX AB (100.0%)

Jönköpingsgatan 83

252 50 Helsingborg, SE

72 Inventor/es:

TIMMERMAND, PÄR OSKAR VILHELMSSON;

TRAN, AMANDA THUY;

STRAND, SVEN-ERIK;

LAMMINMÄKI, URPO JUHANI y

SJÖSTRÖM, KJELL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 728 515 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

Anticuerpo anti-calicleína-2 humanizado

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de los agentes terapéuticos y de diagnóstico y sus usos médicos, particularmente en el campo del cáncer de próstata.

10 **Antecedentes**

15 El cáncer de próstata es en la actualidad la forma más común de cáncer entre los hombres. La próstata es una glándula del tamaño de una nuez en los hombres que produce un líquido que es un componente del semen. La próstata tiene dos o más lóbulos, o secciones, encerradas por una capa externa de tejido. La próstata se encuentra frente al recto y justo debajo de la vejiga de la orina, y rodea la uretra.

20 La aparición del cáncer de próstata es mayor en la parte noroeste de Europa y en los Estados Unidos. El crecimiento del tumor generalmente es un proceso que tiene lugar durante un largo período de tiempo. El cáncer de próstata es normalmente una forma leve de cáncer. De hecho, la mayoría de los hombres diagnosticados con cáncer de próstata sobreviven y se recuperan, y solo una minoría de los hombres se encuentra con una forma más agresiva de cáncer de próstata, que se metastatiza en una etapa temprana. Esta forma agresiva de cáncer de próstata solo puede ser curable si se diagnostica en una etapa temprana, antes de que el cáncer se haya expandido al tejido extracapsular.

25 Hoy en día, el diagnóstico y la monitorización del cáncer de próstata se realiza normalmente midiendo la concentración de un antígeno prostático específico (PSA) en la sangre del paciente. Si la concentración de PSA es marcadamente alta en varias mediciones consecutivas, realizadas en diferentes momentos, la evaluación es que existe una probabilidad de cáncer de próstata. En este momento, se puede realizar una biopsia para verificar el cáncer de próstata.

30 PSA (también conocida como calicleína III) es una proteína, constituida por una cadena única de 237 aminoácidos, que se produce en las células secretoras de la próstata. Estas células secretoras se pueden encontrar en toda la glándula prostática. El PSA es un marcador bien establecido e investigado a fondo con respecto al cáncer de próstata. En comparación con las células sanas, la producción de PSA es más baja en las células malignas y más alta en las células hiperplásicas. Es bastante contradictorio que, de hecho, la concentración de PSA es mayor en la sangre de los hombres que padecen cáncer de próstata. Sin embargo, una explicación puede ser que las células malignas tienen una estructura celular deteriorada y, por lo tanto, son más permeables al PSA.

40 Otra importante serina proteasa adecuada como objetivo para la terapia del cáncer de próstata es la calicleína 2 glandular humana (hK2). El gen que codifica hK2 está ubicado en el cromosoma 19, junto con el gen que codifica el PSA. hK2 se expresa principalmente en el tejido de la próstata, al igual que el PSA. En la próstata, el PSA está presente como una pro-forma inactiva y se activa a través de la acción peptidasa de hK2. La investigación inmunohistoquímica con respecto a hK2 ha demostrado que la hK2 se expresa en relación con el nivel de diferenciación. Esto significa que hK2 se expresa con un mayor rendimiento en tejido de baja diferenciación, tal como el tejido sometido a cáncer de próstata, y en un menor rendimiento en tejido de alta diferenciación, tal como el tejido sometido a hiperplasia prostática benigna (BPH), que es otro problema común de la próstata.

50 Las terapias actuales para el cáncer de próstata son cirugía (por ejemplo, prostatectomía radical), radioterapia por radiación (incluida la braquiterapia y radioterapia de haz externo, ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, fármacos quimioterapéuticos orales, criocirugía (congelación del tumor), terapia hormonal (tal como la terapia antiandrogénica), castración o combinaciones de los anteriores.

55 Sin embargo, la mayoría de estas terapias (cirugía y radioterapia externa), son solo (o principalmente) útiles para el tratamiento de tumores primarios y metástasis grandes. La quimioterapia se usa para diseminar el cáncer, pero para la mayoría de estos pacientes, es un efecto paliativo y/o una supervivencia prolongada. Por lo tanto, otras modalidades de tratamiento o complementarias son necesarias para lograr mejoras considerables de las enfermedades malignas diseminadas, particularmente en casos de micrometástasis.

60 El documento WO 2013/061083 (Fredax AB) divulga agentes que comprenden o consisten en un resto de unión con especificidad para una proteína calicleína (por ejemplo, PSA o hK2) para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata, y un método para el tratamiento del cáncer de próstata en un paciente.

Fisher *et al.* (2002) Prostate 51; 153-165 divulga la generación de anticuerpos monoclonales específicos de hK2.

65 La terapia, tal como la inmunoterapia o la radioinmunoterapia, usando moléculas dirigidas tales como los anticuerpos y los fragmentos podría dar la posibilidad de la terapia de la enfermedad diseminada.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos agentes terapéuticos y usos médicos para tratar y diagnosticar el cáncer de próstata.

Sumario de la invención

5 La invención se define en las reivindicaciones del presente documento.

10 En consecuencia, la presente invención busca mitigar, aliviar o eliminar una o más de las deficiencias identificadas anteriormente en la técnica y desventajas individualmente o en cualquier combinación y resuelve al menos los problemas mencionados anteriormente proporcionando agentes terapéuticos y sus usos médicos de acuerdo con las reivindicaciones de patente adjuntas.

15 Un primer aspecto de la presente invención proporciona un polipéptido de anticuerpo con especificidad de unión para la calicreína-2 humana (hK2), en el que el polipéptido de anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 y una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y en el que la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos estructurales de uno o más anticuerpos.

20 Por lo tanto, los polipéptidos de anticuerpo de la invención comprenden:
(a) una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3

CDRH1:	SDYAWN	SEQ ID NO:1
CDRH2:	YISYSGSTTYNPSLKS	SEQ ID NO:2
CDRH3:	GYYYGSGF	SEQ ID NO:3

y

25 (b) una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6

CDRL1:	KASESVEYFGTSLMH	SEQ ID NO:4
CDRL2:	AASNRES	SEQ ID NO:5
CDRL3:	QQTRKVPYT	SEQ ID NO:6

30 en los que a región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos estructurales de uno o más anticuerpos humanos.

35 Las seis secuencias de aminoácidos anteriores representan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los polipéptidos de anticuerpos de la invención, como se define de acuerdo con Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Immunological Interest*, 5ª edición, NIH, Bethesda, MD.

40 Por "polipéptido de anticuerpo" los investigadores incluyen moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos, así como fragmentos de unión a antígeno y derivados del mismo.

45 El término "aminoácido", como se usa en el presente documento, incluye los veinte aminoácidos convencionales codificados genéticamente y sus estereoisómeros correspondientes en la forma "D" (en comparación con la forma natural de "L"), omega-aminoácidos, otros aminoácidos de origen natural, aminoácidos no convencionales (por ejemplo, aminoácidos α,α -disustituidos, aminoácidos N-alquilo, etc.) y aminoácidos derivados químicamente (véase a continuación).

50 Cuando se enumera específicamente un aminoácido, tal como "alanina" o "Ala" o "A", el término se refiere tanto a L-alanina como a D-alanina a menos que se indique explícitamente otra cosa. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención, siempre que la propiedad funcional deseada sea conservada por el polipéptido. Para los péptidos mostrados, cada resto de aminoácido codificado, cuando sea adecuado, está representado por una sola letra, que corresponde al nombre trivial del aminoácido convencional.

55 En una realización, los polipéptidos como se definen en el presente documento comprenden o consisten en L-aminoácidos.

Los polipéptidos de anticuerpos de la invención muestran especificidad por hK2.

Una secuencia de hK2 a modo de ejemplo se describe como la transcripción: KLK2-201 (ENST00000325321), un

producto del gen ENSG00000167751, tal como figura en la base de datos de conjunto que se puede encontrar en la siguiente dirección de internet en: ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence/Protein?g=ENSG00000167751;r=19:51376689-51383822;t=ENST00000325321 y tiene la siguiente secuencia:

5

MWDLVLSIAL SVGCTGAVPL IQSRIVGGWE CEKHSQPWQV AVYSHGWAHC
GGVLVHPQWV LTAAHCLKKN SQVWLGRHNL FEPEDTGQRV PVSHSFPHPL
YNMSLLKHQS LRPDEDSSHD LMLLRLSEPA KITDVVKVLG LPTQEPALGT
TCYASGWGSI EPEEFLRPRS LQCVSLHLLS NDMCARAYSE KVTEFMLCAG
LWTGGKDTCG GDSGGPLVCN GVLQGITSWG PEPCALPEKP AVYTKVVHYR
KWIKDTIAANP [SEQ ID NO:7]

(en la que la secuencia de la proteína hK2 activa y madura está subrayada, que está precedida en su extremo N por una secuencia peptídica y propeptídica señal)

10

La mayor parte de la hK2 encontrada en el plasma seminal está inactiva y en complejo con el inhibidor de la proteína C (PCI). También es posible que la hK2 forme complejos con otros inhibidores de la proteasa extracelular. Los estudios *in vitro* muestran que hK2 puede unirse a la antiplasmina $\alpha 2$ ($\alpha 2$ -AP), ACT, AMG, antitrombina III (ATIII), inactivador de C1 e inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1).

15

En una realización, el polipéptido de anticuerpo tiene especificidad por la isoforma libre (es decir, no en complejo) de hK2 en comparación con la isoforma en complejo de hK2. Los restos de unión con especificidad para la isoforma libre de hK2 pueden tener especificidad de unión para un epítipo que está expuesto en la isoforma libre de hK2, pero no está expuesto en la isoforma en complejo de hK2, y esto puede ser un epítipo lineal o conformacional (es decir, no lineal). Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede tener especificidad por un epítipo que incluye uno o más restos de aminoácidos que forman parte de la hendidura catalítica de hK2 que se expone en hK2 libre y no se expone en una isoforma en complejo, tal como la forma presente en el líquido seminal cuando hK2 está en complejo con PCI. El mapeo de epítopos de hK2 se describe en Väisänen *et al.*, *Clinical Chemistry* 50:9, 1607-1617 (2004).

20

25 Otros ejemplos de proteínas hK2 se identifican por los siguientes números de acceso:

- (a) GenBank: AAF08277.1;
- (b) GenBank: AAF08275.1; y
- (c) UniProtKB/Swiss-Prot: P20151.1

30

La producción de hK2 recombinante se describe en Lovgren *et al.*, 1999, *Eur. J. Biochem.* 266:1050-5.

Por "especificidad" los investigadores quieren decir que el polipéptido del anticuerpo es capaz de unirse a hK2 *in vivo*, es decir, en las condiciones fisiológicas en las que hK2 existe dentro del cuerpo humano. Preferentemente, el polipéptido de anticuerpo no se une a ninguna otra proteína *in vivo*.

35

Dicha especificidad de unión puede determinarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISA, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, transferencias de Western y citometría de flujo usando células transfectadas que expresan hK2. De manera ventajosa, el polipéptido de anticuerpo es capaz de unirse selectivamente a hK2, es decir, se une al menos 10 veces más fuertemente a hK2 que a otras proteínas (en particular, otras calicreínas, tales como el antígeno específico de la próstata o el PSA). Preferentemente, el polipéptido antigénico no se une a PSA *in vivo*.

40

Los anticuerpos murinos con especificidad para hK2 son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Väisänen *et al.*, 2004, *Clinical Chemistry* 50(9): 1607-1617 describe la producción de anticuerpos monoclonales en ratones con especificidad por hK2. Dos de los anticuerpos, designados "11B6" y "7D7", se consideran selectivos para hK2.

45

Las secuencias de aminoácidos del componente de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 11B6 se divulgan en la solicitud de patente internacional n.º WO 2013/061083; véase, en particular, las SEQ ID No: 4 y 5 en la misma.

50

Los polipéptidos de anticuerpos de la presente invención se basan en una versión humanizada seleccionada del anticuerpo 11B6, que muestra propiedades favorables inesperadas.

55 En particular, los anticuerpos humanizados de la invención muestran una relación terapéutica mejorada en

comparación con el anticuerpo murino 11B6 parental (m11B6) del que se obtienen sus secuencias de CDR (véase el Ejemplo 6).

5 Por "relación terapéutica mejorada" los investigadores quieren decir que el polipéptido de anticuerpo de la invención (una forma humanizada del anticuerpo 11B6), cuando se administra a un paciente con un tumor de próstata, proporciona una mayor relación de dosis absorbida de tumor a dosis absorbida de médula ósea (sana) que el anticuerpo murino 11B6 parental (en comparación con la misma radioactividad y vía de administración). La relación de dosis absorbida de tumor a médula ósea puede calcularse usando el método descrito en el Ejemplo 6.

10 El inesperado mejor perfil terapéutico de los anticuerpos de la invención permite usar dosis de radiación más altas (dosis absorbidas), lo que conduce a una mayor eficacia en el tratamiento del cáncer de próstata sin aumentar los efectos secundarios o el "daño colateral" en tejidos y órganos sanos.

15 La humanización (también llamada remodelación o injerto de CDR) es una técnica para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales de fuentes xenogénicas (comúnmente, de roedores tales como los ratones) y para mejorar su activación del sistema inmunitario humano (véase la revisión de Almagro y Fransson, 2008, *Frontiers in Bioscience* 13:1619-1633). Hay varios anticuerpos monoclonales humanizados en ensayos clínicos y algunos han recibido aprobación para ser usados como fármacos. Aunque la mecánica de producir el anticuerpo monoclonal diseñado por ingeniería usando las técnicas de biología molecular es relativamente sencilla, el injerto simple de las regiones determinantes de la complementariedad de los roedores (CDR) en los marcos humanos no siempre reconstituye la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal original. Para humanizar un anticuerpo, el diseño del anticuerpo humanizado es una etapa crítica en la reproducción de la función de la molécula original.

25 El diseño de un anticuerpo humanizado incluye varias elecciones clave, incluidas las extensiones de las CDR que se usarán y los marcos humanos que se usarán. Sin embargo, para conservar la especificidad del anticuerpo parental, también puede ser crítico sustituir uno o más restos del mAb de roedor en las regiones marco humanas (llamadas retromutaciones). La identificación de la posición de las retromutaciones necesarias requiere una secuencia detallada/análisis estructural. Recientemente, se han usado bibliotecas de fagos para variar los aminoácidos en las posiciones elegidas. De forma similar, se han usado muchos enfoques para elegir los marcos humanos más adecuados para injertar las CDR de roedores. Los primeros experimentos usaron un subconjunto limitado de anticuerpos monoclonales humanos bien caracterizados (a menudo cuando la estructura estaba disponible), independientemente de la identidad de la secuencia con el anticuerpo monoclonal de roedor (el llamado enfoque de marcos fijos). Algunos grupos usan regiones variables con alta identidad de secuencia de aminoácidos con las regiones variables de roedores (coincidencia de homología o mejor ajuste); otros usan secuencias de consenso o de línea germinal, mientras que otros seleccionan fragmentos de las secuencias marco dentro de cada región variable de cadena ligera o pesada de varios anticuerpos monoclonales humanos diferentes. También existen enfoques para la humanización desarrollados que reemplazan los restos de roedores de la superficie con los restos más comunes encontrados en los anticuerpos monoclonales humanos ("acondicionalmente de la superficie" o "recubrimiento") y los que usan definiciones diferentes de las extensiones de las CDR.

40 Sin embargo, a pesar del exhaustivo estudio de la humanización de anticuerpos, algunos anticuerpos monoclonales de roedores han demostrado ser difíciles de humanizar.

45 El desarrollo de los polipéptidos de anticuerpos de la invención requirió retromutaciones no solo en las regiones marco, sino también en algunas de las CDR (véase el Ejemplo 1 a continuación). Por lo tanto, las seis secuencias de CDR representadas anteriormente en las SEQ ID NO:1 a 6 se obtienen del anticuerpo anti-hK2 murino 11B6, pero contienen mutaciones en CDRH2 (SEQ ID NO:2) y CDRL1 (SEQ ID NO:4) en relación con el anticuerpo murino parental. Estas mutaciones en las CDR se realizaron para conferir una especificidad y estabilidad óptimas en la versión humanizada de 11B6.

50 En una realización, los polipéptidos de anticuerpos de la invención se unen a hK2 con una K_D superior a $0,1 \times 10^{-9}$ M.

55 Los métodos para medir la afinidad global (K_D) y la velocidad de asociación (k_a) y la velocidad de disociación (k_d) de una interacción (tal como una interacción entre un anticuerpo y un ligando) son bien conocidos en la técnica. Los métodos *in vitro* a modo de ejemplo se describen en el Ejemplo 3 a continuación. También es posible usar métodos basados en citometría de flujo (Sklar *et al.*, 2002, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31:97-119).

60 De manera ventajosa, el polipéptido de anticuerpo de la invención tiene una afinidad (K_D) por hK2 inferior a $1,0 \times 10^{-10}$ M, por ejemplo una K_D inferior a $9,0 \times 10^{-11}$ M, $8,0 \times 10^{-11}$ M, $7,0 \times 10^{-11}$ M, $6,0 \times 10^{-11}$ M, $5,0 \times 10^{-11}$ M, $4,0 \times 10^{-11}$ M, $3,0 \times 10^{-11}$ M, $2,0 \times 10^{-11}$ M o inferior a $1,0 \times 10^{-11}$ M.

65 Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos de anticuerpos de la invención pueden constituir cadenas pesadas de anticuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno y derivados de los mismos.

En una realización, el polipéptido de anticuerpo comprende o consiste en un anticuerpo intacto (es decir, completo), tal como una molécula de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM.

5 De manera ventajosa, el polipéptido de anticuerpo comprende o consiste en una molécula de IgG intacta, o un fragmento o derivado de unión a antígeno de la misma.

La molécula de IgG puede ser de cualquier subtipo conocido, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

10 Por "fragmentos de unión a antígeno y derivados" de anticuerpos, los investigadores incluyen fragmentos Fv (por ejemplo, Fv de cadena simple y Fv unido por disulfuro), fragmentos similares a Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos F(ab)₂ y anticuerpos de dominio (por ejemplo, dominios variables V_H o dominios variables V_L).

15 Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede comprender o consistir en un fragmento scFv o Fab.

Un rasgo característico adicional de los polipéptidos de anticuerpos de la presente invención es la presencia de secuencias de aminoácidos estructurales de uno o más anticuerpos humanos en las regiones variables de cadena pesada y ligera.

20 Por "secuencias marco" los investigadores incluyen las regiones de los dominios variables de cadena pesada y ligera que no sean las CDR. Típicamente, cada dominio variable comprenderá cuatro regiones marco, designadas FR1 a FR4, dentro de las cuales se ubican las secuencias de CDR:

FR1 --- CDR1 --- FR2 --- CDR2 --- FR3 --- CDR3 --- FR4

25 Se apreciará que las secuencias de aminoácidos de las regiones marco pueden ser completamente humanas o pueden contener una o más retromutaciones (es decir, la secuencia de aminoácidos presente en el marco humano puede estar sustituida con el aminoácido encontrado en la posición correspondiente dentro del dominio variable de roedor del que se obtienen las CDR). En consecuencia, las secuencias de FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera del polipéptido de anticuerpo de la invención pueden ser de origen no natural.

30 En una realización, las secuencias marco del polipéptido de anticuerpo comparten al menos el 70 % de identidad de secuencia con regiones marco de uno o más anticuerpos humanos, por ejemplo, al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más. Por lo tanto, el polipéptido de anticuerpo puede comprender una región FR1 de cadena pesada que comparte al menos el 70 % de identidad de secuencia con una región FR1 de un anticuerpo humano. Sin embargo, se apreciará, que las cadenas pesada y ligera del polipéptido del anticuerpo pueden compartir la identidad de secuencia con las regiones marco de diferentes anticuerpos humanos.

40 El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, mediante el programa LALIGN (Huang and Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357) en el sitio de la instalación de Expasy (http://www.ch.embnet.org/software/IALIGN_form.html) usando como parámetros la opción de alineación global, matriz de puntuación BLOSUM62, penalización de hueco de apertura -14, penalización de hueco de ampliación -4. Como alternativa, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos se puede determinar usando programas informáticos adecuados, por ejemplo, el programa GAP del grupo de computación genética de la

45 Universidad de Wisconsin y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuya secuencia se ha alineado de manera óptima.

La alineación puede llevarse a cabo como alternativa usando el programa Clustal W (como se describe en Thompson *et al.*, 1994, Nucl. Acid Res. 22:4673-4680). Los parámetros usados pueden ser los siguientes:

- 50
- Parámetros rápidos de alineación por pares: tamaño de la tupla K (palabra); 1, tamaño de la ventana; 5, penalización de hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento.
 - Parámetros de alineación múltiple: Penalización por apertura de hueco; 10, penalización por extensión de hueco; 0,05.
 - 55 - Matriz de puntuación: BLOSUM.

Como alternativa, el programa BESTFIT puede usarse para determinar alineaciones de secuencias locales.

60 En una realización, las secuencias marco del dominio variable pesado del polipéptido de anticuerpo de la invención están codificadas por la familia de genes VH4 de inmunoglobulina humana.

Por ejemplo, las secuencias marco pueden estar codificadas, al menos en parte, por un gen de línea germinal VH4-28 (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 pueden codificarse por VH4-28 y FR4 puede codificarse por JH1).

65 El polipéptido de anticuerpo de la presente invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8:

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGNSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYS
 GSTTYNPSLKSRTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCATGYYYGSGFWGQ
 GTLVTVSS

[SEQ ID NO: 8]

y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9:

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVEYFGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYAAS
 NRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTRKVPYT FGQGTKLEIK

[SEQ ID NO: 9]

5

En una realización, las secuencias marco del dominio variable ligero del polipéptido de anticuerpo de la invención están codificadas por la familia de genes Kappa V4 de inmunoglobulina humana.

10 Por ejemplo, las secuencias marco pueden estar codificadas, al menos en parte, por un gen de línea germinal IgkV4-B3 (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 pueden codificarse por IgkV4-B3 y FR4 puede codificarse por JK2).

Por "al menos en parte" los investigadores incluyen que las secuencias marco comprenden al menos diez aminoácidos contiguos codificados por el gen de referencia, por ejemplo al menos 20 aminoácidos contiguos. También incluyen que una o más, pero no todas, las regiones FR están codificadas por el gen de referencia (por ejemplo, FR1 y FR2 pueden estar codificadas por el gen de referencia, pero no FR3).

15

Opcionalmente, el polipéptido de anticuerpo de la invención comprende además una región constante de cadena pesada, o parte de la misma.

20

En una realización, el polipéptido de anticuerpo comprende una región CH1, CH2 y/o CH3 de una cadena pesada de IgG (tal como una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Por lo tanto, el polipéptido de anticuerpo puede comprender parte o la totalidad de las regiones constantes de una cadena pesada de IgG1. Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede ser un fragmento Fab que comprende las regiones constantes CH1 y CL.

25

En una realización, el polipéptido de anticuerpo puede comprender una región Fc de anticuerpo. Un experto en la técnica apreciará que la porción Fc puede ser de un anticuerpo IgG, o de una clase diferente de anticuerpo (tal como IgM, IgA, IgD o IgE). En una realización, la región Fc es de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

30

La región Fc puede ser de origen natural (por ejemplo, parte de un anticuerpo producido de manera endógena) o puede ser artificial (por ejemplo, que comprende una o más mutaciones puntuales en relación con una región de Fc de origen natural y/o modificaciones a los restos de carbohidratos dentro del dominio CH2). Las regiones Fc con mutaciones puntuales que mejoran su capacidad para unirse a FcR pueden ser ventajosas, por ejemplo, alterando la semivida del suero o modulando (es decir, aumentando o reduciendo) la unión a los receptores de Fcy (FcyR) involucrados en ADCC y CDC.

35

De manera ventajosa, el polipéptido de anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, o parte de la misma:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[SEQ ID NO: 10]

40

Opcionalmente, el polipéptido de anticuerpo de la invención comprende además una región constante de cadena

ligera, o parte de la misma.

En una realización, el polipéptido de anticuerpo comprende una región CL de una cadena ligera de IgG (tal como una cadena ligera kappa o lambda)

- 5 Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, o parte de la misma:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[SEQ ID NO: 11]

- 10 De manera ventajosa, el polipéptido de anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 y una región constante de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

- 15 En una realización preferente, el polipéptido de anticuerpo de la invención comprende:
 (a) una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 (en la que la región variable está en **negrita** y las secuencias de CDR están en *cursiva* en recuadro)

Q V Q L Q E S G P G L V K P S D T L S
L T C A V S G N S I T *S D Y A W N W I*
R Q P P G K G L E W I G *Y I S Y S G S*
T T Y N P S L K S **R V T M S R D T S K**
N Q F S L K L S S V T A V D T A V Y Y
C A T *G Y Y Y G S G F* **W G Q G T L V T**
V S S A S T K G P S V F P L A P S S K
 S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E
 P V T V S W N S G A L T S G V H T F P
 A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S
 S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T
 K V D K K V E P K S C D K T H T C P P
 C P A P E L L G G P S V F L F P P K P
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V
 S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H
 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V
 S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q
 P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q
 Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T

20

Q K S L S L S P G K

[SEQ ID NO: 12]

25 y/o

(b) una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 (en la que la región variable está en negrita y las secuencias de CDR están en cursiva en recuadro)

```

D I V L T Q S P D S L A V S L G E R A
T I N C K A S E S V E Y F G T S L M H
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S N
R E S G V P D R F S G S G S G T D F T
L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q T
R K V P Y T F G Q G T K L E I K R T V
A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T
A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W
K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y
E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V
T K S F N R G E C
    
```

[SEQ ID NO: 13]

5 Por ejemplo, el polipéptido de anticuerpo puede comprender o consistir en dos cadenas pesadas de SEQ ID NO:12 y dos cadenas ligeras de SEQ ID NO:13, unidas por puentes disulfuro para formar una estructura típica de anticuerpo IgG.

10 Los polipéptidos de anticuerpos de la invención pueden comprender o consistir en uno o más aminoácidos que han sido modificados o derivados.

Los derivados químicos de uno o más aminoácidos se pueden lograr por reacción con un grupo lateral funcional. Dichas moléculas derivadas incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que se han derivado grupos amino libres para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluensulfonilo, grupos carboxibenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivar para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres e hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivar para formar derivados de O-acilo o de O-alquilo. También se incluyen como derivados químicos aquellos péptidos que contienen derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: la 4-hidroxiprolina puede ser sustituida por la prolina; la 5-hidroxilisina puede ser sustituida por la lisina; la 3-metilhistidina puede ser sustituida por la histidina; la homoserina puede ser sustituida por la serina y la ornitina por la lisina. Los derivados también incluyen péptidos que contienen una o más adiciones o eliminaciones, siempre que se mantenga la actividad requerida. Otras modificaciones incluidas son la amidación, la acilación del terminal amino (por ejemplo, la acetilación o la amidación con ácido tioglicólico), la carboxilamidación terminal (por ejemplo, con amoniaco o metilamina), y modificaciones terminales similares.

Los expertos en la técnica apreciarán además que los compuestos peptidomiméticos también pueden ser útiles. El término "peptidomimético" se refiere a un compuesto que imita la conformación y las características deseables de un péptido particular como agente terapéutico.

30 Por ejemplo, el dicho polipéptido incluye no solo moléculas en las que los restos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino también moléculas en las que se invierte el enlace peptídico. Dichos peptidomiméticos retroinversos pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como los descritos en Meziere *et al.* (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica preparar pseudopéptidos que contengan cambios que involucren la cadena principal y no la orientación de las cadenas laterales. Los péptidos retroinversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis. Como alternativa, el dicho polipéptido puede ser un compuesto peptidomimético en el que uno o más de los restos de aminoácidos están unidos por un enlace -y(CH₂NH)- en lugar del enlace amida convencional.

40 En una alternativa adicional, el enlace peptídico se puede dispensar en conjunto siempre que se use un resto enlazador adecuado que conserve la separación entre los átomos de carbono de los restos de aminoácidos; puede ser ventajoso que el resto enlazador tenga sustancialmente la misma distribución de carga y sustancialmente la misma planaridad que un enlace peptídico.

45 Se apreciará que el dicho polipéptido puede ser bloqueado oportunamente en su extremo N o C para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exoproteolítica.

También se han usado diversos aminoácidos no codificados o modificados, tales como los D-aminoácidos y los N-metil-aminoácidos para modificar los péptidos de los mamíferos. Además, una presunta conformación bioactiva puede estabilizarse mediante una modificación covalente, tal como la ciclación o la incorporación de lactama u otros tipos de puentes, por ejemplo, véase Veber *et al.*, 1978, Proc. Natl Acad Sci. USA 75:2636 y Thursell *et al.*, 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166.

Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos de anticuerpos de la invención pueden aumentarse con un resto funcional para facilitar su uso pretendido, por ejemplo, como un agente de formación de imágenes *in vivo* o agente terapéutico.

Por lo tanto, en una realización, el polipéptido del anticuerpo está unido, directa o indirectamente, a un resto terapéutico.

Se puede usar cualquier resto terapéutico adecuado. Un resto terapéutico adecuado es aquel que es capaz de reducir o inhibir el crecimiento, o en particular matar, una célula de cáncer de próstata. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un resto citotóxico. Un resto citotóxico puede comprender o consistir en uno o más radioisótopos. Por ejemplo, uno o más radioisótopos pueden seleccionarse cada uno independientemente de entre el grupo que consiste en emisores beta, emisores Auger, emisores de electrones de conversión, emisores alfa y emisores de baja energía fotónica. Puede desearse que el uno o más radioisótopos tengan cada uno independientemente un patrón de emisión de energía absorbida localmente que crea una alta dosis absorbida en la vecindad del agente. Los radioisótopos a modo de ejemplo pueden incluir emisores beta de largo alcance, tales como ⁹⁰Y, ³²P, ¹⁸⁶Re/¹⁸⁸Re; ¹⁶⁶Ho, ⁷⁶As/⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ¹⁵³Sm; emisores beta de alcance medio, tales como ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ⁶⁷Cu, ¹⁶¹Tb, ¹⁰⁵Rh; emisores beta de baja energía, tales como ⁴⁵Ca o ³⁵S; emisores Auger o de conversión, tales como ⁵¹Cr, ⁶⁷Ga, ⁹⁹Tc^m, ¹¹¹In, ^{114m}In, ¹²³I, ¹²⁵I, ²⁰¹Tl; y emisores alfa, tales como ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ac, ²²⁵Ac, ²¹²Pb, ²⁵⁵Fm, ²²³Ra, ¹⁴⁹Tb y ²²¹At. Otros radionucleidos están disponibles y se podrán usar para terapia.

En otra realización, puede desearse que el resto terapéutico o el resto citotóxico no sea un resto como se divulga como un "indicador" en el documento WO 2006/087374 A1, en particular en la página 11, líneas 7-15 del mismo.

En una realización preferente, el polipéptido de anticuerpo está unido a (o de otra manera marcado con) el radioisótopo ¹⁷⁷Lu.

Como alternativa, el resto terapéutico puede comprender o consistir en uno o más fármacos terapéuticos (tales como citotóxicos), por ejemplo, un fármaco citostático; un fármaco anti-andrógeno; cortisona y derivados de la misma; un fosfonato; un inhibidor de la testosterona-5- α -reductasa; un añadido de boro; una citoquina; taspigargina y sus metabolitos; una toxina (tal como saporina o caliqueamicina); un agente quimioterapéutico (tal como un antimetabolito); o cualquier otro fármaco terapéutico o citotóxico útil en el tratamiento del carcinoma de próstata.

Los fármacos terapéuticos/citotóxicos a modo de ejemplo pueden incluir, por ejemplo:

- Citostáticos, en particular aquellos con efectos secundarios limitantes de la dosis, que incluyen, pero sin limitación, ciclofosamida, clorambucilo, ifosfamida, busulfano, lomustina, taxanos, fosfato de estramustina y otras mostazas nitrogenadas, antibióticos (que incluyen doxorubicina, caliqueamicinas y esperamicina), alcaloides de la vinca, azaridinas, compuestos que contienen platino, endostatina, alquilsulfonatos, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, enzimas, urea sustituida, derivados de metilhidrazina, daunorubicina, aminas anfipáticas,
- Antiandrógenos, tales como flutamida y bicalutamida y metabolitos de los mismos;
- Cortisona y derivados de la misma;
- Fosfonatos, tales como difosfonato y bupfosfonato;
- Inhibidores de la testosterona-5- α -reductasa;
- Añadidos de boro;
- Citoquinas;
- Taspigargina y sus metabolitos;
- Otros agentes usados en el tratamiento del carcinoma de próstata.

Como alternativa, el resto citotóxico puede comprender o consistir en uno o más restos adecuados para su uso en terapia de activación, tales como terapia de activación de fotones, terapia de activación de neutrones, terapia de electrones Auger inducida por neutrones, terapia de irradiación con sincrotrón o terapia de activación de fotones de rayos X de baja energía.

Por ejemplo, con los polipéptidos de anticuerpos de la invención, existe la posibilidad de usar radiación de sincrotrón (o rayos X de baja energía) para el avance de la radioterapia, centrándose principalmente en la llamada radioterapia de fotoactivación (PAT), en la que la deposición de energía local de la irradiación con rayos X externa se ve aumentada en el tejido canceroso por la interacción con un agente de dirección de tumores con alto Z pre-administrado.

La modalidad de tratamiento PAT utiliza rayos X monocromáticos de una fuente de sincrotrón, tales como los proporcionados por la línea de luz biomédica ID17 en la instalación europea de radiación de sincrotrón (ESRF) en Grenoble, y según lo previsto, estará disponible en otras instalaciones en el futuro, tales como la nueva Instalación de sincrotrón sueca, Max-IV.

5 Como una posible modalidad de tratamiento adicional, la investigación sobre la "terapia inducida de tumores con electrones de Auger" es la próxima fuente de espalación europea (ESS) en Lund, y con suerte una estación médica experimental. Los neutrones térmicos y semi-térmicos producidos por los reactores se han usado durante mucho tiempo para la terapia de captura de boro-neutrones, BNCT, tanto para experimentos preclínicos como para el
10 tratamiento de tumores cerebrales con las partículas alfa inducidas y el núcleo de retroceso (^7Li) que proporcionan una alta energía absorbida localmente. Un enfoque similar es usar neutrones y moléculas adecuadas dirigidas a tumores marcadas con núcleos estables con una sección transversal alta para neutrones. Los anticuerpos o péptidos se pueden marcar, por ejemplo, con gadolinio estable (^{157}Gd) y actúan como la molécula objetivo para los neutrones que son capturados por el núcleo de Gd, lo que se conoce como terapia de captura de neutrones de gadolinio (GdNCT). Mediante las técnicas de Monte Carlo, la distribución de la dosis en el tumor y los tejidos circundantes se
15 calcula como resultado de los fotones γ , neutrones, retrocesos nucleares, así como rayos X característicos, conversión interna y electrones Auger de gadolinio u otros elementos potenciales.

20 Como se ha analizado anteriormente, el resto terapéutico (tal como un radioisótopo, resto citotóxico o similar) puede unirse directamente, o indirectamente, al resto de unión (tal como un anticuerpo o fragmento del mismo). Los enlazadores adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grupos protésicos, enlazadores no fenólicos (derivados de N-succimidilbenzoatos; dodecaborato), restos quelantes tanto de macrocíclicos como quelantes acíclicos, tales como derivados del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10 tetraacético (DOTA), deferoxamina (DFO), derivados del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), derivados del ácido S-2-(4-
25 isotiocianatobencil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) y derivados del ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA), derivados del ácido 3,6,9,15-tetraazabiciclo [9.3.1]-pentadeca-1 (15),11,13-trieno-4-(S)-(4-isotiocianatobencil)-3,6,9-triacético (PCTA), derivados del ácido 5-S-(4-aminobencil)-1-oxa-4,7,10-triazaciclododecano-4,7,10-tris(acético) (D03A) y otros restos quelantes. El uso de dichos enlazadores puede ser particularmente adecuado en circunstancias en las que el agente comprende o consiste en un anticuerpo o
30 fragmento del mismo como el resto de unión unido, a través de un enlazador, a un radioisótopo como el resto terapéutico.

Un enlazador preferido es DTPA, por ejemplo, como se usa en ^{177}Lu -DTPA-[polipéptido de anticuerpo de la invención].
35

Un enlazador preferido adicional es deferoxamina, DFO, por ejemplo, como se usa en ^{89}Zr -DFO-[polipéptido de anticuerpo de la invención].

Opcionalmente, el polipéptido de anticuerpo de la invención puede (o no) comprender además un resto detectable. Por ejemplo, un resto detectable puede comprender o consistir en un radioisótopo, tal como un radioisótopo
40 seleccionado de entre el grupo que consiste en $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{123}I y ^{201}Tl . Opcionalmente, el agente puede comprender un par de radionúclidos detectables y citotóxicos, tales como $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ or $^{124}\text{I}/^{211}\text{At}$. Como alternativa, el agente puede comprender un radioisótopo que sea capaz de actuar simultáneamente de manera multimodal como un resto detectable y también como un resto citotóxico para proporcionar los llamados
45 teragnósticos multimodales". De este modo, los restos de unión pueden acoplarse a nanopartículas que tienen la capacidad de formar múltiples imágenes (por ejemplo, SPECT, PET, MRI, óptica o ultrasonido) junto con capacidad terapéutica usando fármacos citotóxicos, tales como radionúclidos o agentes de quimioterapia. También se incluye con la presente invención la posibilidad de tratamiento por hipertermia usando campos magnéticos alternos de alta frecuencia e imágenes de ultrasonido acompañadas.

50 Como alternativa, el resto detectable puede comprender o consistir en un isótopo paramagnético, tal como un isótopo paramagnético se selecciona de entre el grupo que consiste en ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr y ^{56}Fe .

55 En el caso de que el polipéptido de anticuerpo comprenda un resto detectable, entonces el resto detectable puede ser detectable mediante una técnica de formación de imágenes tal como SPECT, PET, MRI, óptica o ultrasonidos.

Los restos terapéuticos y detectables pueden conjugarse o combinarse de otra manera con el polipéptido de anticuerpo usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, la terapia inmunocombinada existente, gemtuzumab ozogamicina [nombre comercial: Mylotarg®], comprende un anticuerpo monoclonal unido a la
60 citotoxina caliquicina).

En una realización adicional, el polipéptido de anticuerpo de la invención se usa para tratar el cáncer de próstata en forma de una formulación que comprende una población de moléculas de polipéptido de anticuerpo. En una opción, todos (o sustancialmente todos, tales como más del 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o más, en peso) de las moléculas de polipéptido de anticuerpo en la población comprenden el mismo resto terapéutico. En otra opción, la población
65 comprende una mezcla de otros agentes con diferentes restos terapéuticos. Esta opción ofrecerá posibilidades para

mejorar los efectos de la terapia de radionúclidos dirigida usando diversos agentes, tales como agentes de quimioterapia, agentes de terapia hormonal u otra combinación de terapias en las que el agente de dirección no solo suministre radionúclidos terapéuticamente activos a los antígenos asociados al tumor, sino que también radiosensibilice simultáneamente las células del tumor objetivo mediante la modulación (por ejemplo, activación o bloqueo) de una cascada de señalización intracelular. Esta opción también es útil para tratar el cáncer de próstata con una mezcla de agentes citotóxicos, por ejemplo, usando un cóctel de alfa y diferentes alcances de emisores beta. o un cóctel de radionúclidos con diferente alcance, LET (transferencia de energía lineal) y RBE (efecto biológico relativo), para el tratamiento combinado de tumores grandes, micrometástasis y células tumorales únicas. En una realización, pueden usarse emisores de largo alcance para el tratamiento de tumores grandes, y pueden usarse emisores de corto alcance para el tratamiento de tumores más pequeños tales como micrometástasis y células tumorales únicas.

Opcionalmente, el polipéptido de anticuerpo de la presente invención puede (o no) comprender además un resto para aumentar la semivida *in vivo* del agente. Los restos a modo de ejemplo para aumentar la semivida *in vivo* del agente pueden incluir polietilenglicol (PEG), albúmina de suero humano, grupos de glucosilación, ácidos grasos y dextrano. PEG puede ser particularmente contemplado.

Se apreciará que los polipéptidos de la invención pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su uso, por ejemplo, mediante secado por congelación, secado por pulverización, enfriamiento por pulverización o mediante el uso de formación de partículas (precipitación) a partir de dióxido de carbono supercrítico. Se puede emplear cualquier método de liofilización adecuado (por ejemplo, secado por congelación, secado por pulverización, secado de la torta) y/o técnicas de reconstitución. Los expertos en la técnica apreciarán que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad y que los niveles de uso deben ajustarse hacia arriba para compensar. Preferentemente, el polipéptido liofilizado (congelado por pulverización) pierde no más de aproximadamente el 1 % de su actividad (antes de la liofilización) cuando se rehidrata, o no más de aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, o no más de aproximadamente el 50 % de su actividad (antes de la liofilización) cuando se rehidrata.

Los métodos para la producción de polipéptidos de la invención son bien conocidos en la técnica.

De manera práctica, el polipéptido es o comprende un polipéptido recombinante. Los métodos adecuados para la producción de dichos polipéptidos recombinantes son bien conocidos en la técnica, tales como la expresión en células huésped procarióticas o eucariotas (por ejemplo, véase Sambrook y Russell, 2000, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Los polipéptidos de anticuerpos de la invención también pueden producirse usando un sistema de traducción *in vitro* disponible en el mercado, tal como lisado de reticulocitos de conejo o lisado de germen de trigo (disponible en Promega). Preferentemente, el sistema de traducción es lisado de reticulocitos de conejo. De manera práctica, el sistema de traducción se puede acoplar a un sistema de transcripción, tal como el sistema de traducción de transcripción TNT (Promega). Este sistema tiene la ventaja de producir un transcrito de ARNm adecuado a partir de un polinucleótido de ADN codificante en la misma reacción que la traducción.

Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse como alternativa de forma artificial, por ejemplo, usando técnicas bien conocidas de síntesis en fase líquida o en fase sólida (tales como la síntesis de péptidos en fase sólida t-Boc o Fmoc).

Un segundo aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de anticuerpo de la invención, o un componente de cadena polipeptídica del mismo. Por "molécula de ácido nucleico" los investigadores incluyen ADN (por ejemplo, ADN genómico o ADN complementario) y moléculas de ARNm, que pueden ser monocatenario o bicatenario.

En una realización, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los expertos en la técnica apreciarán que la molécula de ácido nucleico puede ser codón-optimizada para la expresión del polipéptido de anticuerpo en una célula huésped particular, por ejemplo, para la expresión en células humanas (por ejemplo, véase Angov, 2011, *Biotechnol. J.* 6(6):650-659).

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende

(a) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:14

ES 2 728 515 T3

CAG GTT CAG CTG CAG GAA AGC GGA CCT GGC TTG GTG AAA CCC AGC
GAT ACC CTT AGC CTG ACA TGT GCT GTG TCT GGC AAT TCC ATC ACT
TCC GAC TAT GCG TGG AAC TGG ATT CGG CAA CCA CCG GGA AAA GGG
CTC GAG TGG ATA GGG TAC ATC AGC TAT TCT GGT TCA ACC ACG TAC
AAT CCC TCA CTG AAG AGT AGG GTT ACC ATG TCC AGA GAC ACC TCC

AAG AAC CAG TTC AGC CTG AAG CTG AGT AGT GTG ACA GCC GTA GAT
ACA GCC GTC TAT TAC TGC GCA ACA GGG TAC TAC TAT GGC TCT GGC
TTT TGG GGT CAA GGA ACT CTC GTC ACT GTG TCA AGC

[SEQ ID NO: 14]

5 y/o

(b) la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:15

GAC ATA GTG CTC ACT CAG AGC CCT GAT AGC TTG GCT GTC AGT CTT
GGG GAA AGA GCC ACC ATC AAC TGC AAA GCG TCC GAA AGC GTC GAG
TAT TTC GGG ACT AGC CTG ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCC GGA
CAA CCG CCT AAG CTG CTG ATC TAT GCA GCC TCT AAT CGC GAA AGT
GGC GTT CCA GAC AGG TTT TCC GGT TCT GGA TCA GGC ACA GAC TTC
ACC CTC ACG ATT TCC TCA CTG CAA GCT GAG GAT GTA GCC GTG TAC
TAC TGT CAG CAG ACA CGG AAA GTG CCC TAC ACC TTT GGT CAG GGC
ACA AAG CTG GAG ATT AAG

[SEQ ID NO: 15]

10

También se divulga en el presente documento lo siguiente:

- (a) un vector (tal como un vector de expresión) que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención;
- 15 (b) una célula huésped (tal como una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana) que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector como se ha divulgado anteriormente; y
- 20 (c) un método para fabricar un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende cultivar una población de células huésped como se ha divulgado anteriormente en condiciones en las que se expresa dicho polipéptido, y aislar el polipéptido del mismo.

25 Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido de anticuerpo del primer aspecto de la invención y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 También pueden incluirse compuestos adicionales en las composiciones farmacéuticas, que incluyen, agentes quelantes, tales como EDTA, citrato, EGTA o glutatión.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de una manera conocida en la técnica que sea suficientemente estable en almacenamiento y adecuada para la administración a seres humanos y animales. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden liofilizarse, por ejemplo, mediante secado por congelación, secado por pulverización, enfriamiento por pulverización o mediante el uso de la formación de partículas a partir de la formación de partículas supercríticas.

Por "farmacéuticamente aceptable" los investigadores quieren decir un material no tóxico que no disminuye la

eficacia de la actividad de unión a la proteína de la calicreína del agente de la invención. Dichos tampones, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000).

5 El término "tampón" pretende significar una solución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con la finalidad de estabilizar el pH. Ejemplos de tampones son Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazoláctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

10 El término "diluyente" pretende significar una solución acuosa o no acuosa con la finalidad de diluir el agente en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

15 El término "adyuvante" pretende significar cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del agente de la invención. El adyuvante puede ser una o más de sales de zinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitación, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferentes composiciones acilicas. El adyuvante también puede ser polímeros catiónicos tales como éteres de celulosa catiónicos, ésteres de celulosa catiónicos, ácido hialurónico desacetilado, quitosano, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos tales como poli(vinil imidazol) y polipéptidos catiónicos tales como polihistidina, polilisina, poliarginina y péptidos que contienen esos aminoácidos.

20 El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenina, ácido hialurónico y derivados del mismo, poli(ácido acrílico), polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros polietileno/óxido de propileno, alcohol polivinílico/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis y la polivinilpirrolidona, todos ellos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para lograr la bioadhesión, o para proteger el lípido de la degradación química y proteolítica. Ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di- y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glucolípidos, todos ellos de diferente longitud de cadena de acilo y saturación, lecitina de huevo, lecitina de soja, huevo hidrogenado y lecitina de soja, que se añaden a la composición por razones similares a las de los polímeros. Ejemplos de minerales son el talco, el óxido de magnesio, el óxido de zinc y el óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como la reducción de la acumulación de líquido o las propiedades de pigmento ventajosas.

30 Los polipéptidos de anticuerpos de la invención pueden formularse en cualquier tipo de composición farmacéutica conocida en la técnica como adecuada para el suministro de los mismos.

35 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de un liposoma, en el que se combina el polipéptido de anticuerpo, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos, que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Los lípidos adecuados también incluyen los lípidos modificados anteriormente por el poli(etilenglicol) en el grupo de la cabeza polar para prolongar el tiempo de circulación del torrente sanguíneo. La preparación de dichas formulaciones liposomales se puede encontrar por ejemplo en el documento US 4.235.871.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de microesferas biodegradables. Poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(carprolactona) (PCL), y polianhídridos se han usado ampliamente como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de dichas microesferas se pueden encontrar en los documentos US 5.851.451 y EP 0 213 303.

45 En una realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma de geles poliméricos, en los que polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa de celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenina, ácido hialurónico y derivados del mismo, poli(ácido acrílico), polivinil imidazol, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros polietileno/óxido de propileno, alcohol polivinílico/polivinilacetato de diferente grado de hidrólisis y la polivinilpirrolidona se usan para espesar la solución que contiene el agente. Los polímeros también pueden comprender gelatina o colágeno.

Como alternativa, los polipéptidos de anticuerpos pueden disolverse simplemente en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo), goma de tragacanto y/o diversos tampones.

5 Se apreciará que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir iones y un pH definido para la potenciación de la acción del polipéptido del anticuerpo activo. Además, las composiciones pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc.

10 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la técnica. Por lo tanto, las posibles vías de administración incluyen parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral y rectal. También es posible la administración desde implantes. La infusión puede ser una vía deseada debido a la citotoxicidad potencialmente alta del agente administrado.

15 En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intracerebroventricular, intraarticular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se usan oportunamente en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben tamponarse adecuadamente (por ejemplo, a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

20 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estéril acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados y pueden almacenarse en un estado criodesecado (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

25 Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, la administración intravenosa o la administración local a un tumor en un paciente (por ejemplo, intra-tumoral o peri-tumoral).

30 Las composiciones farmacéuticas se administrarán a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz, es decir, una dosis absorbida terapéuticamente eficaz del radionúclido terapéutico.

35 En el contexto del uso terapéutico de los polipéptidos de anticuerpos de la invención, una "cantidad farmacéuticamente eficaz", o "cantidad eficaz", o "terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección dada y régimen de administración. Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un soporte o vehículo de administración. Además, pretende significar una cantidad suficiente para reducir y/o evitar, un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del huésped. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para causar una mejora en una afección clínicamente significativa en un huésped. Como aprecian los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y el uso para la fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. El personal médico experto puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz basándose en las características del paciente, tales como la edad, el peso, el sexo, la afección, las complicaciones, otras enfermedades, etc., como es bien conocido en la técnica (véase el Ejemplo 8 a continuación). La administración de la dosis farmacéuticamente eficaz puede llevarse a cabo tanto por administración única en forma de una unidad de dosis individual o también por varias unidades de dosis más pequeñas y también por múltiples administraciones de dosis subdivididas a intervalos específicos. Como alternativa, las dosis pueden proporcionarse como una infusión continua durante un período prolongado.

45 En el contexto del uso diagnóstico de los polipéptidos de anticuerpos de la invención, una "cantidad farmacéuticamente eficaz", o "cantidad eficaz", o "diagnóstico eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a esa cantidad que proporciona una señal detectable para finalidades de imágenes *in vivo*.

60 Los polipéptidos de anticuerpos de la invención pueden formularse a diversas concentraciones, dependiendo de la

eficacia/toxicidad del compuesto que se esté usando. La formulación puede comprender el polipéptido a una concentración de entre 0,1 μM y 1 mM, entre 1 μM y 500 μM , entre 500 μM y 1 mM, entre 300 μM y 700 μM , entre 1 μM y 100 μM , entre 100 μM y 200 μM , entre 200 μM y 300 μM , entre 300 μM y 400 μM , entre 400 μM y 500 μM y aproximadamente 500 μM .

5 Típicamente, la dosis terapéutica del polipéptido de anticuerpo (con o sin un resto terapéutico) en un paciente humano estará en el intervalo de 100 μg a 700 mg por administración (basándose en un peso corporal de 70 kg). Por ejemplo, la dosis terapéutica máxima puede estar en el intervalo de 0,1 a 10 mg/kg por administración, por ejemplo, entre 0,1 y 5 mg/kg o entre 1 y 5 mg/kg o entre 0,1 y 2 mg/kg. Se apreciará que dicha dosis se puede
10 administrar a diferentes intervalos, según lo determine el oncólogo/médico; por ejemplo, una dosis puede administrarse diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente.

Los expertos en la técnica apreciarán que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse solas o en combinación con otros agentes terapéuticos usados en el tratamiento de un cáncer de próstata, o antes, después o al mismo tiempo que el tratamiento del paciente con otras modalidades terapéuticas para el tratamiento del cáncer de próstata, tales como otros anticuerpos terapéuticos, cirugía (por ejemplo, prostatectomía radical),
15 terapia con radionúclidos, braquiterapia, radioterapia de haz externo, ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, fármacos quimioterapéuticos orales, criocirugía (congelación del tumor), terapia hormonal (tal como la terapia antiandrogénica), castración o combinaciones de los anteriores.

20 También se divulga en el presente documento un kit que comprende un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, junto con instrucciones para el uso del mismo como se describe en el presente documento.

25 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en medicina.

Un quinto aspecto de la invención proporciona un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de cáncer de próstata.
30

Se divulga además en el presente documento un método de tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

35 Por "tratamiento" los investigadores incluyen tanto el tratamiento terapéutico como el profiláctico del paciente. El término "profiláctico" se usa para abarcar el uso de un agente, o una formulación del mismo, como se describe en el presente documento que evita o reduce la probabilidad de cáncer de próstata, o la propagación, diseminación o metástasis del cáncer de próstata localizado en un paciente o sujeto. El término "profiláctico" también abarca el uso de un agente, o formulación del mismo, como se describe en el presente documento para evitar la reaparición del
40 cáncer de próstata en un paciente que ha sido tratado previamente por cáncer de próstata.

También se divulga además en el presente documento un método de diagnóstico del cáncer de próstata en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad diagnósticamente eficaz de un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención.
45

Por "diagnóstico" los investigadores incluyen la detección de células de cáncer de próstata, ya sea *in vivo* (es decir, dentro del cuerpo de un paciente) o *ex vivo* (es decir, dentro de una muestra de tejido o célula extraída del cuerpo de un paciente).

50 El cáncer de próstata que se va a tratar o diagnosticar puede estar localizado en la próstata o puede ser un cáncer de próstata no localizado (es decir, diseminado). El cáncer de próstata localizado en la próstata puede, por ejemplo, clasificarse como cánceres clínicos T1 o T2 de acuerdo con el sistema TNM (abreviado de tumor/nódulos/metástasis) mientras que el cáncer de próstata no localizado/diseminado puede, por ejemplo, clasificarse como cánceres clínicos T3 o T4.

55 El cáncer de próstata que se va a tratar o diagnosticar puede ser un cáncer de próstata metastásico. La metástasis se refiere a la propagación de un cáncer desde su ubicación original a otros sitios en el cuerpo. Por ejemplo, el cáncer de próstata metastásico que se va a tratar o diagnosticar puede ser una metástasis presente en el sistema linfático; en el hueso (incluyendo la columna vertebral, vértebras, pelvis, costillas); metástasis dentro de la pelvis, el recto, la vejiga o la uretra. Las metástasis presentes en otras ubicaciones menos comunes también pueden tratarse con la presente invención. Las metástasis pueden ser micrometástasis. La micrometástasis es una forma de metástasis en la cual los tumores recién formados son generalmente demasiado pequeños para ser detectados, o detectados con dificultad. Por ejemplo, la presente invención proporciona al experto en la técnica medios para tratar células cancerosas individuales o agrupaciones celulares, incluso si la presencia de dichas células o agrupaciones
60 no pueden diagnosticarse pero existen, por ejemplo, como enfermedad diseminada oculta.
65

En consecuencia, se anticipa que una ventaja técnica particularmente importante del tratamiento proporcionado por la presente invención en comparación con los tratamientos del cáncer de próstata de la técnica anterior es la eficacia aumentada en el tratamiento del cáncer de próstata diseminado y/o metastásico (incluyendo el micrometastásico).

5 Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona polipéptidos de anticuerpos y usos médicos de los mismos para evitar o tratar la metástasis de un tumor de próstata primario.

10 El cáncer de próstata tiende a desarrollarse en hombres mayores de cincuenta años, más comúnmente en hombres mayores de 60, 65 o 70 años, y aunque es uno de los tipos de cáncer más prevalentes en hombres, muchos nunca presentan síntomas, no se someten a terapia y finalmente mueren de otras causas. Esto se debe a que el cáncer de próstata es, en la mayoría de los casos, de crecimiento lento, sin síntomas, y dado que los hombres con la afección son mayores, a menudo mueren por causas no relacionadas con el cáncer de próstata, tales como enfermedad cardíaca/circulatoria, neumonía, otros cánceres no relacionados, o vejez. Aproximadamente dos tercios de los casos de cáncer de próstata crecen lentamente, el otro tercio es más agresivo y se desarrolla rápido.

15 En consecuencia, el desarrollo de métodos eficaces para el tratamiento y diagnóstico del cáncer de próstata es particularmente importante para el tratamiento de formas más agresivas y de rápido desarrollo del cáncer, particularmente en pacientes más jóvenes. En consecuencia, en una realización, la invención se refiere al tratamiento o diagnóstico del cáncer de próstata en un paciente que tiene menos de 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 20 50, 45, 40 o menos años en el momento del diagnóstico de cáncer de próstata y/o en el momento del tratamiento.

25 Se piensa que los hombres que tienen un familiar de primer grado (padre o hermano) con cáncer de próstata tienen el doble de riesgo de desarrollar cáncer de próstata, y los que tienen dos familiares de primer grado afectados tienen un riesgo cinco veces mayor en comparación con los hombres sin antecedente familiar. En consecuencia, la invención puede referirse al tratamiento o diagnóstico del cáncer de próstata en un paciente que se caracteriza por que uno, dos o más miembros de la familia, en particular miembros de familia de primer grado (tales como un padre o hermano), ha sido previamente diagnosticado con cáncer de próstata.

30 La invención también se refiere al tratamiento o diagnóstico del cáncer de próstata en un paciente, en el que el cáncer de próstata que se va a tratar tiene cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). El CRPC puede caracterizarse por volverse normalmente refractario al tratamiento hormonal después de uno a tres años y reanudar el crecimiento a pesar de la terapia hormonal.

35 En los usos médicos de la invención, el polipéptido de anticuerpo se inyecta o infunde normalmente en el cuerpo del paciente. *In vivo*, el polipéptido de anticuerpo se une a los tejidos que producen el antígeno objetivo, hK2; principalmente, células de cáncer de próstata y metástasis de las mismas. Al unirse, el polipéptido de anticuerpo puede ejercer directamente un efecto terapéutico (por ejemplo, inducir la muerte celular a través de ADCC, CDC o en virtud de llevar un radioisótopo u otro grupo citotóxico). Como alternativa, el polipéptido de anticuerpo unido puede servir como una herramienta de diagnóstico (imagen), que puede guiar la elección de la terapia o ayudar a la extirpación quirúrgica de las células cancerosas.

40 Los expertos en la técnica apreciarán que los polipéptidos de anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con otros agentes/tratamientos terapéuticos y/o diagnósticos, tales como radioterapia externa, cirugía, citostáticos y tratamientos con andrógenos.

45 La descripción anterior se centra en las realizaciones de la presente invención aplicables al tratamiento y diagnóstico del cáncer de próstata. Sin embargo, se apreciará que los polipéptidos de anticuerpo de la invención no se limitan a dichas aplicaciones sino que pueden ser útil para exámenes postoperatorios y exámenes durante o después de tratamientos con radiación, citostáticos y andrógenos.

50 En otra realización, se puede usar la cirugía radioguiada (RGS) o la cirugía guiada por imágenes (IGS) para identificar los polipéptidos de anticuerpos marcados con indicador de la invención durante y/o antes de la cirugía. Por lo tanto, un polipéptido de anticuerpo que comprende un resto detectable como se ha analizado anteriormente puede administrarse durante y/o antes de la cirugía. En esta realización, los polipéptidos de anticuerpos pueden infundirse primero. Posteriormente, RGS/IGS se puede usar para identificar tejido productor de hK2 con un instrumento de detección sensible al resto detectable, durante o antes de la cirugía. El resto detectable puede ser, por ejemplo, un resto detectable sensible a la radiación magnética o emisor de radiación; puede ser, por ejemplo, un emisor de radiación Cerenkov y/o Bremsstrahlung; puede ser un marcador fluorescente y/o un marcador magnético o magnetizable. En consecuencia, la RGS/IGS de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, un método que se basa en la detección de radiación óptica, Cerenkov, Bremsstrahlung o beta; la detección de un marcador de radionúclido, y/o puede implicar magnetometría. La RGS es bien conocida por el experto en la técnica como una técnica quirúrgica que permite al cirujano identificar el tejido "marcado" por el resto detectable.

65 Las visualizaciones obtenidas de acuerdo con los métodos anteriores pueden combinarse con otros métodos de visualización radiológica, tales como la SPECT/PET, la tomografía computarizada (TC), los ultrasonidos (US) y la formación de imágenes mediante resonancia (IRM).

En consecuencia, también se divulga en el presente documento polipéptidos de anticuerpos para su uso en medicina mediante la administración a un paciente con cáncer de próstata antes o durante la cirugía, tal como la cirugía radioguiada o guiada por imágenes.

5 Se divulga además en el presente documento un método *in vitro* para la detección de células tumorales de próstata en la sangre de un sujeto, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una muestra de sangre de un sujeto para ser analizado;
- (b) opcionalmente, extraer y/o purificar células presentes en la muestra de sangre;
- 10 (c) poner en contacto un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención con células presentes en la muestra de sangre;
- (d) determinar (directa o indirectamente) si el polipéptido de anticuerpo se une a hK2 libre (es decir, sin complejar)

15 en el que la unión del polipéptido de anticuerpo a hK2 libre es indicativa de la presencia de células tumorales de próstata en la sangre de un sujeto.

Por lo tanto, el método comprende realizar un ensayo para determinar si la muestra de sangre contiene hK2 libre; siendo la presencia de hK2 libre indicativa de la presencia de células tumorales de próstata en la sangre de un sujeto.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que hay muchas formas de realizar dicho ensayo. Por ejemplo, el inmunoensayo podría ser homogéneo o, más preferentemente, heterogéneo. El ensayo también podría realizarse en un formato competitivo o, más preferentemente, no competitivo.

25 En el caso del ensayo heterogéneo, no competitivo, un protocolo a modo de ejemplo podría ser:

- (a) proporcionar una muestra de sangre de un sujeto para ser analizado;
- (b) opcionalmente, extraer y/o purificar células presentes en la muestra de sangre;
- 30 (c) poner en contacto un polipéptido de anticuerpo inmovilizado en fase sólida de acuerdo con el primer aspecto de la invención con células presentes en la muestra de sangre;
- (d) lavar para eliminar los componentes solubles (no unidos a la superficie sólida);
- (e) añadir el indicador, es decir, otro anticuerpo específico anti-hK2 marcado con una molécula/partícula indicadora;
- 35 (f) lavar para eliminar el anticuerpo indicador no unido; y
- (g) detectar la señal del anticuerpo indicador

Entre las etapas b y c o c y d, normalmente debe haber un período de incubación para permitir que la célula produzca hK2 soluble, y luego para que se detecte.

40 También se divulga en el presente documento un método *in vitro* para la detección de células tumorales de próstata en el tejido de un sujeto, comprendiendo el método

- (a) proporcionar una muestra de tejido (tal como una muestra histológica) de un sujeto para ser analizado;
- 45 (b) opcionalmente, extraer y/o purificar células presentes en la muestra de tejido;
- (c) poner en contacto un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la invención con células presentes en la muestra de tejido;
- (d) determinar (directa o indirectamente) si el polipéptido de anticuerpo se une a hK2 libre (es decir, sin complejar)

50 en el que la unión del polipéptido de anticuerpo a hK2 libre es indicativa de la presencia de células tumorales de próstata en el tejido de un sujeto.

En los métodos *in vitro* anteriores, la etapa (d) se realiza mediante ELISA. Sin embargo, se puede usar cualquier ensayo adecuado para detectar interacciones anticuerpo-antígeno *in vitro*.

Además, el método comprende además la cuantificación de las células tumorales de próstata en la muestra.

60 Los métodos *in vitro* anteriores pueden usarse para el diagnóstico de cáncer de próstata en un sujeto.

El uso del término "un" o "una" cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno/a", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

65 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor haciendo referencia a uno o

más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

5 **Figura 1:** Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y ligera del fragmento Fab 11B6 humanizado a modo de ejemplo de la invención.

Figura 2: Gel SDS-PAGE con muestras nativas y reducidas de anticuerpos 11B6 murinos y humanizados.

10 **Figura 3:** Fases de asociación tras la unión de los anticuerpos 11B6 de prueba a hK2 en un chip.

Figura 4: Fases de disociación de los anticuerpos 11B6 de prueba.

Figura 5: Biodistribución de anticuerpos 11B6 humanizados marcados con ¹⁷⁷Lu.

15 **Figura 6:** Imagen de SPECT a modo de ejemplo que muestra la unión de h11B6 marcado con ¹⁷⁷Lu a un tumor de próstata en ratones.

Figura 7: Porcentaje de captación de h11B6 y m11B6 marcados con ¹⁷⁷Lu en el tumor y el hueso.

20 **Figura 8:** Relación de porcentaje de captación por gramo de h11B6 y m11B6 marcados con ¹⁷⁷Lu en el tumor al hueso.

Figura 9: Cinética del (a) anticuerpo 11B6 humanizado y (b) anticuerpo 11B6 murino.

25 **Figura 10:** Eliminación de h11B6 y m11B6 marcados con ¹⁷⁷Lu de la sangre.

Figura 11: Fotografías representativas del tamaño del tumor antes (imagen superior) y después (imagen inferior) del tratamiento con ¹⁷⁷Lu-11B6.

30 **Figura 12:** Resumen del efecto de (a) cantidad de radioactividad única "D" de ¹⁷⁷Lu-11B6, (b) cantidad de radioactividad doble "2 x D" de ¹⁷⁷Lu-11B6 y (c) tratamiento de control en el tamaño del tumor en xenoinjertos LNCaP.

35 **Figura 13:** (a) datos de crecimiento del tumor y (b) una imagen de SPECT para un ratón con xenoinjertos LNCaP tratado con una dosis única de ¹⁷⁷Lu-11B6.

40 **Figura 14:** Volumen del tumor en función de los días posteriores a la inyección para (a) animales que reciben anticuerpo h11B6 marcado con ¹⁷⁷Lu de acuerdo con la invención, (b) animales que reciben anticuerpo de "control de isótopo" de IgG no específico marcado con ¹⁷⁷Lu y (c) animales que reciben NaCl solamente. El tratamiento se administró el día 0. Los animales se terminaron en el caso de los siguientes casos: grandes volúmenes de tumores (diámetro > 14 mm); pérdida de peso grande (pérdida de peso > 15 % en comparación con el peso inicial); condición general afectada negativamente; o una combinación de estos tres parámetros. (los números a la derecha son el número de ID de cada animal)

45 **Figura 15:** Curva de Kaplan-Meier para los tres grupos de tratamiento que se muestran en la Figura 14. Línea continua: ¹⁷⁷Lu-h11B6; Línea discontinua: Anticuerpo de "control de isotipo" de IgG no específico marcado con ¹⁷⁷Lu; línea de puntos: NaCl.

50 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones particulares de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen modos específicos para su práctica.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de anticuerpo con especificidad de unión para la calicreína-2 humana (hK2), en donde el polipéptido de anticuerpo comprende
- 5 (a) una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; y
(b) una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:9.
- 10 2. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende o consiste en un anticuerpo intacto o un fragmento de unión a antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en fragmentos Fv y fragmentos de tipo Fab.
- 15 3. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una región constante de cadena pesada, o parte de la misma, en el que la región constante de cadena pesada es de un subtipo de inmunoglobulina seleccionado de entre el grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4.
- 20 4. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una región constante de cadena ligera, o parte de la misma, en el que la región constante de cadena ligera es de una cadena ligera kappa o lambda.
- 25 5. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, que comprende una región constante de cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 y/o una región constante de cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.
- 30 6. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 y/o una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13.
- 35 7. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido de anticuerpo está unido, directa o indirectamente, a un resto terapéutico.
- 40 8. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido de anticuerpo comprende además un resto detectable.
- 45 9. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en el que el resto terapéutico y/o el resto detectable están unidos al polipéptido de anticuerpo indirectamente, a través de un resto de enlace.
10. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el resto de enlace es un quelante seleccionado de entre el grupo que consiste en derivados del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10,tetraacético (DOTA), deferoxamina (DFO), derivados del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), derivados del ácido S-2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA) y derivados del ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA).
11. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 50 12. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:14 y/o SEQ ID NO:15.
13. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables.
- 55 14. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en medicina.
- 60 15. Un polipéptido de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento y/o el diagnóstico del cáncer de próstata.

FIGURA 1

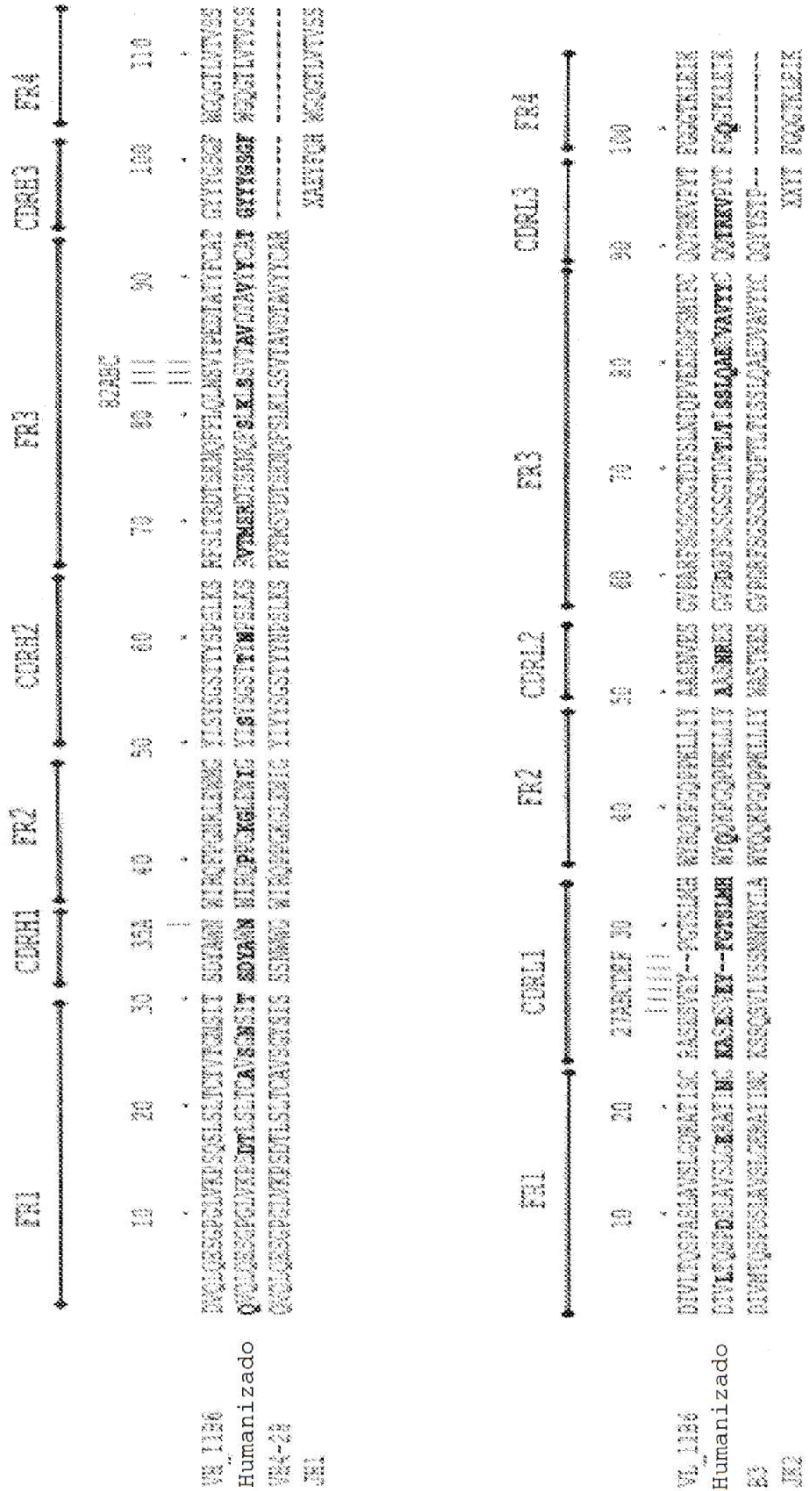


FIGURA 2

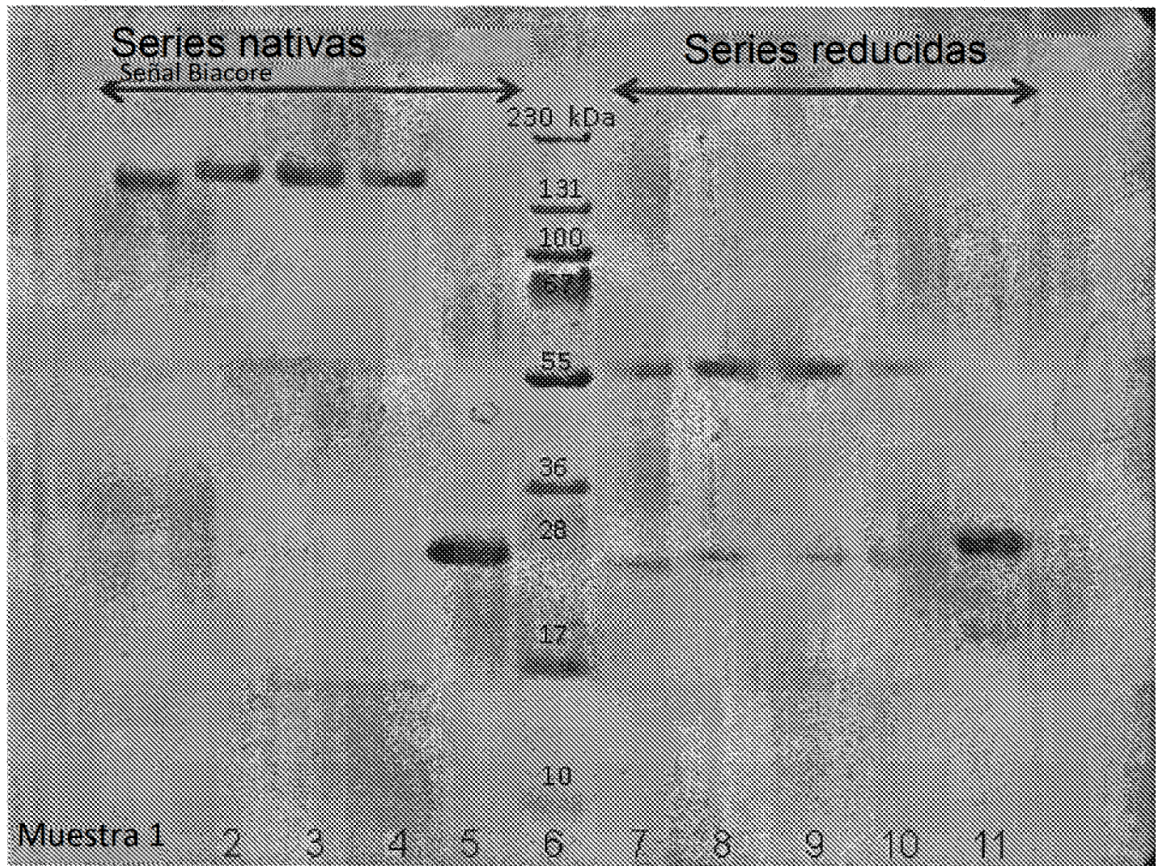


FIGURA 3

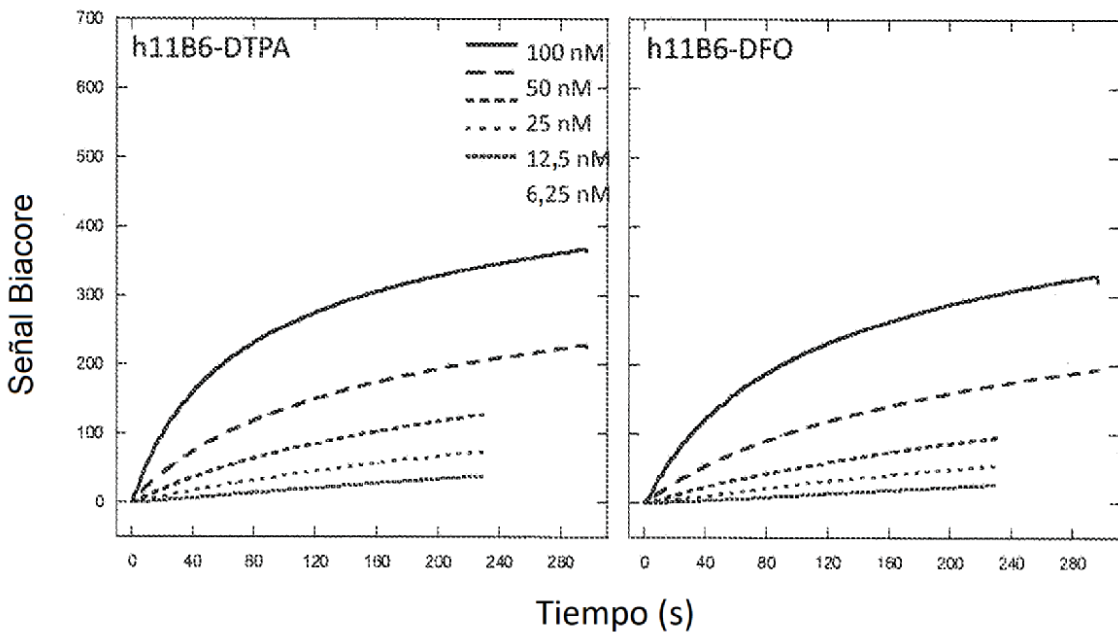
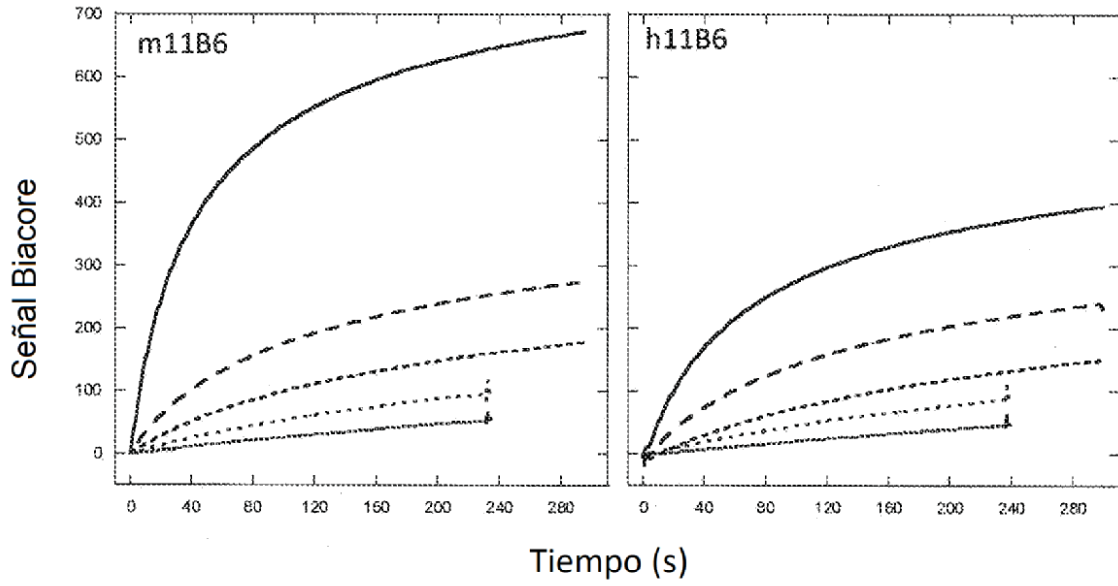


FIGURA 4

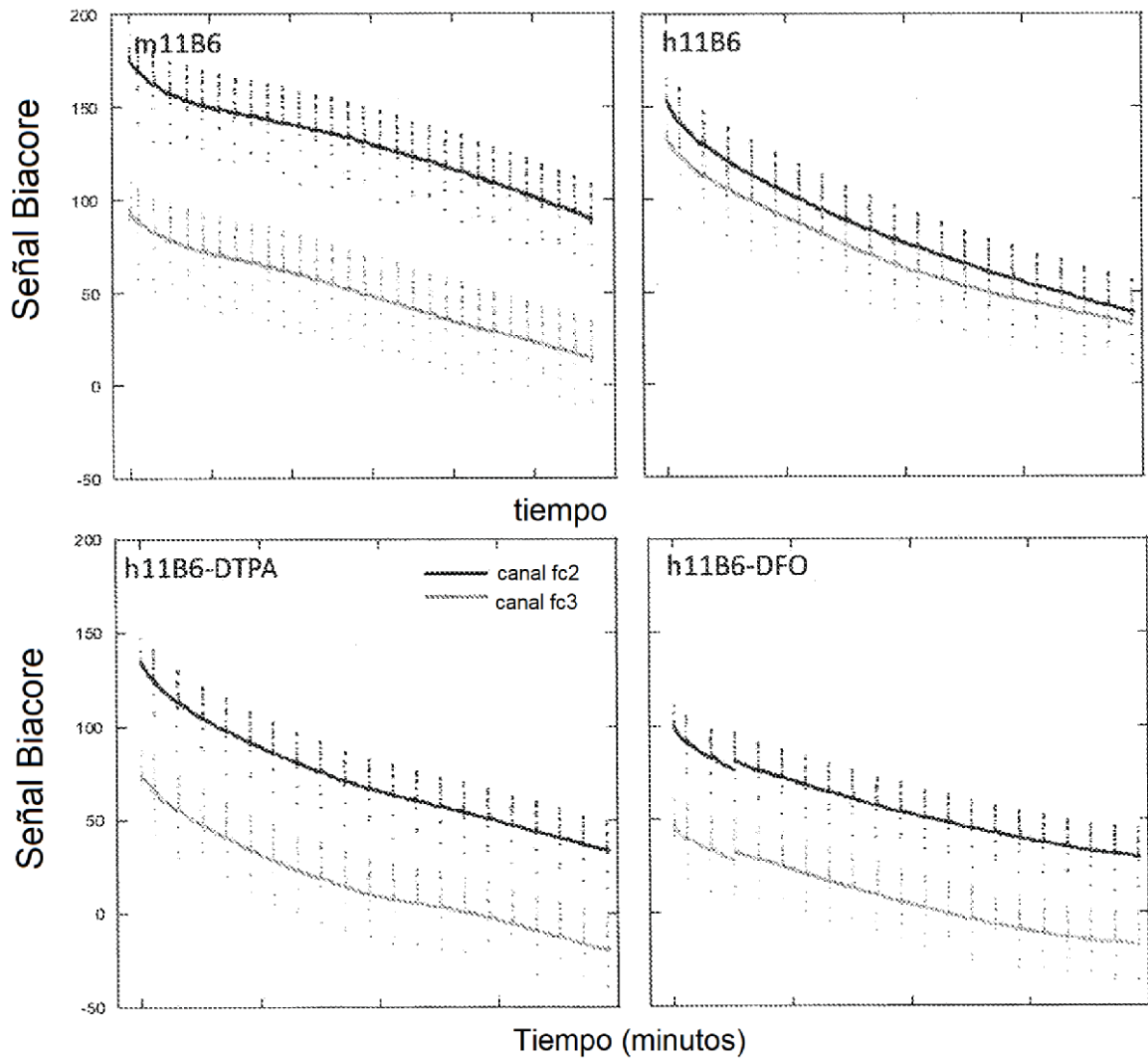


FIGURA 5

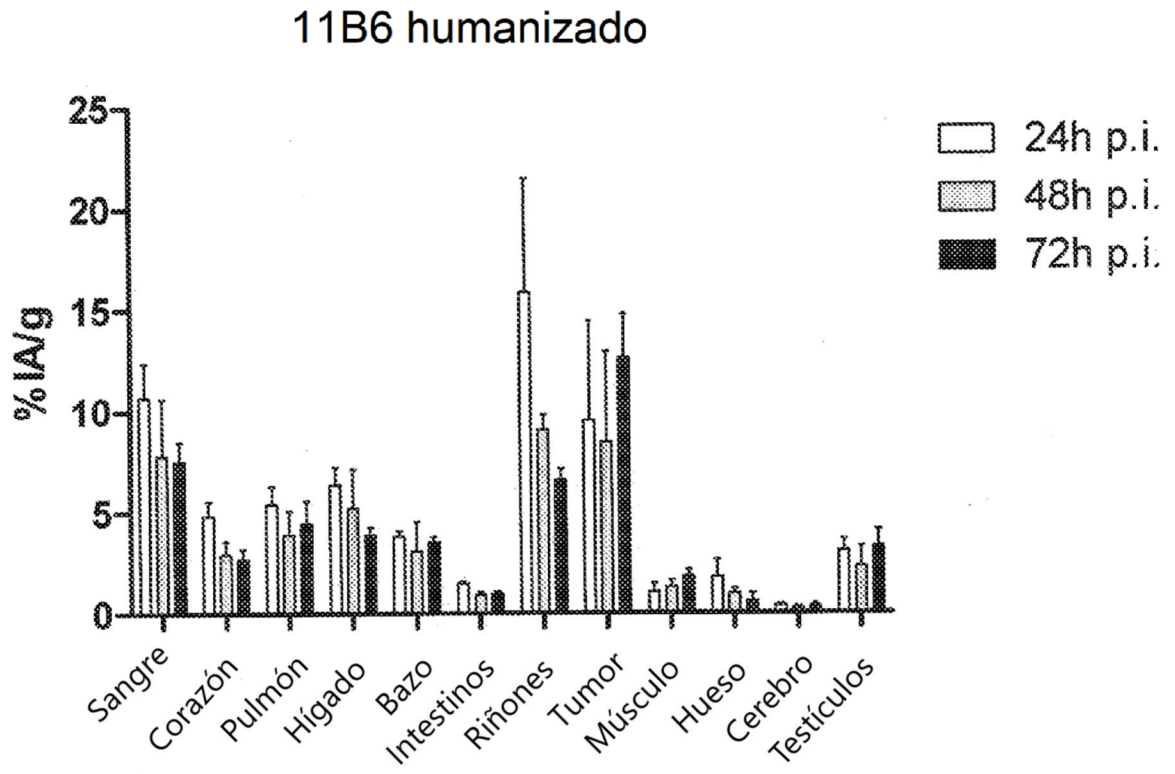


FIGURA 6



FIGURA 7

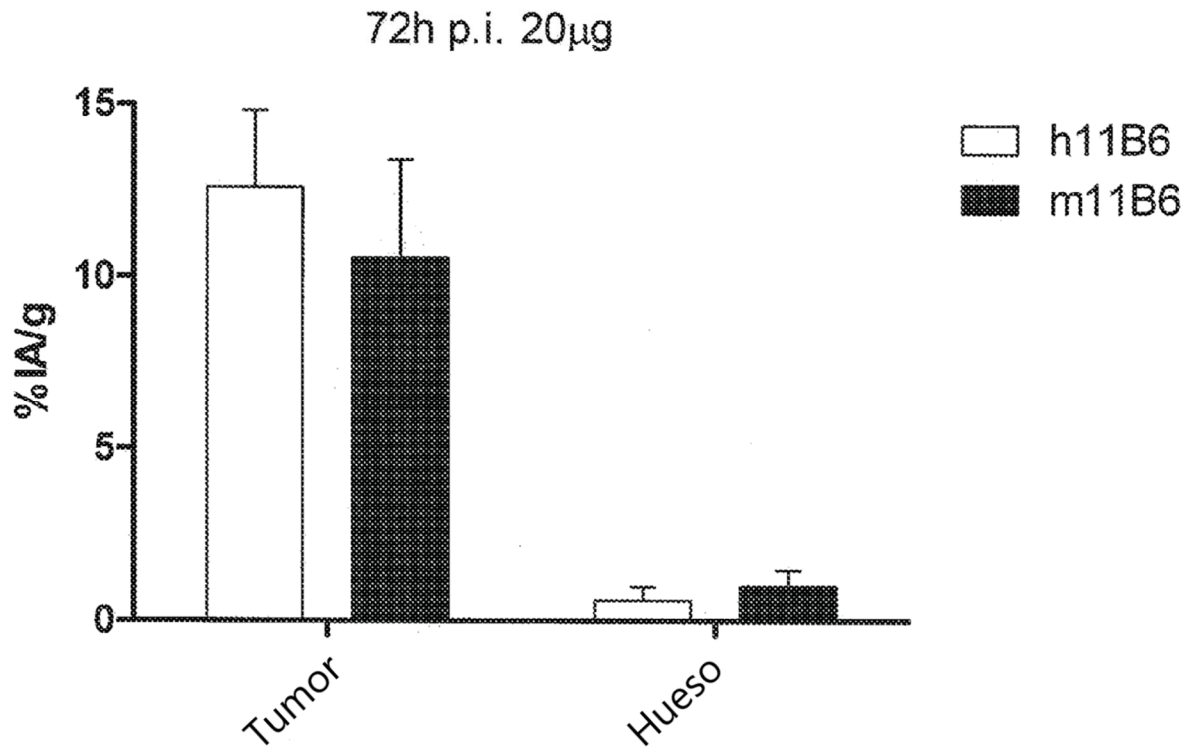


FIGURA 8

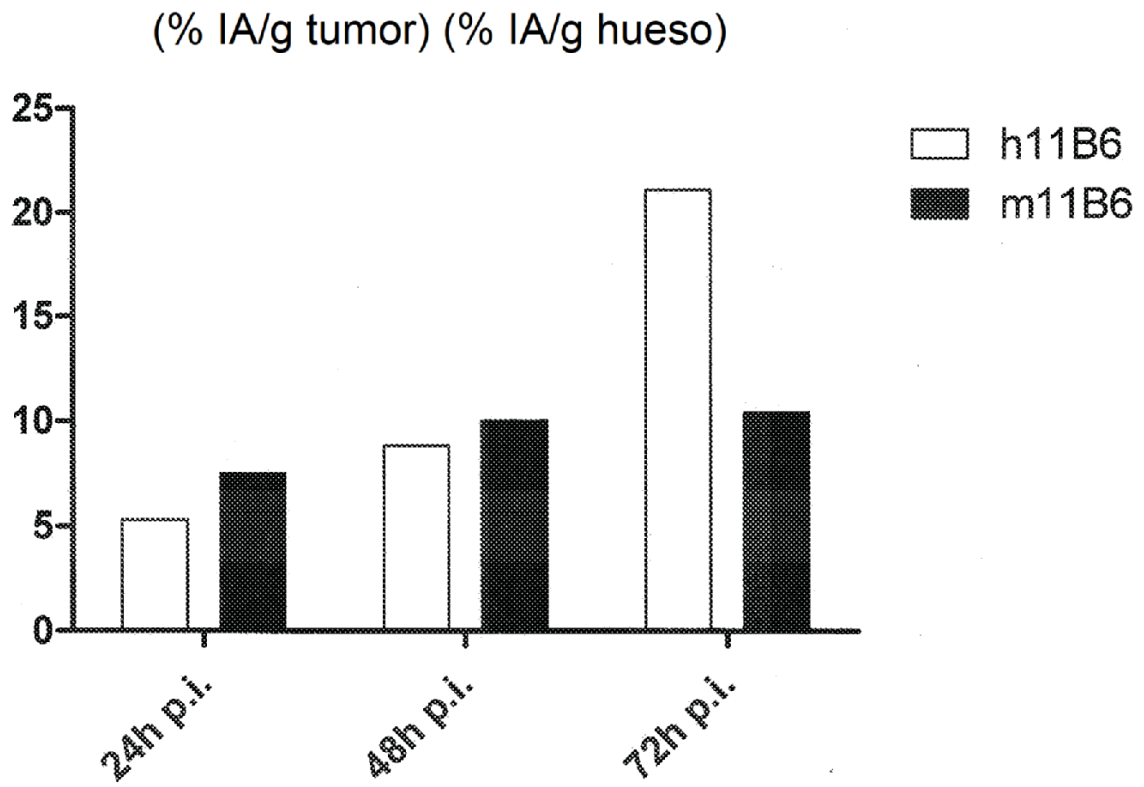


FIGURA 9(A)

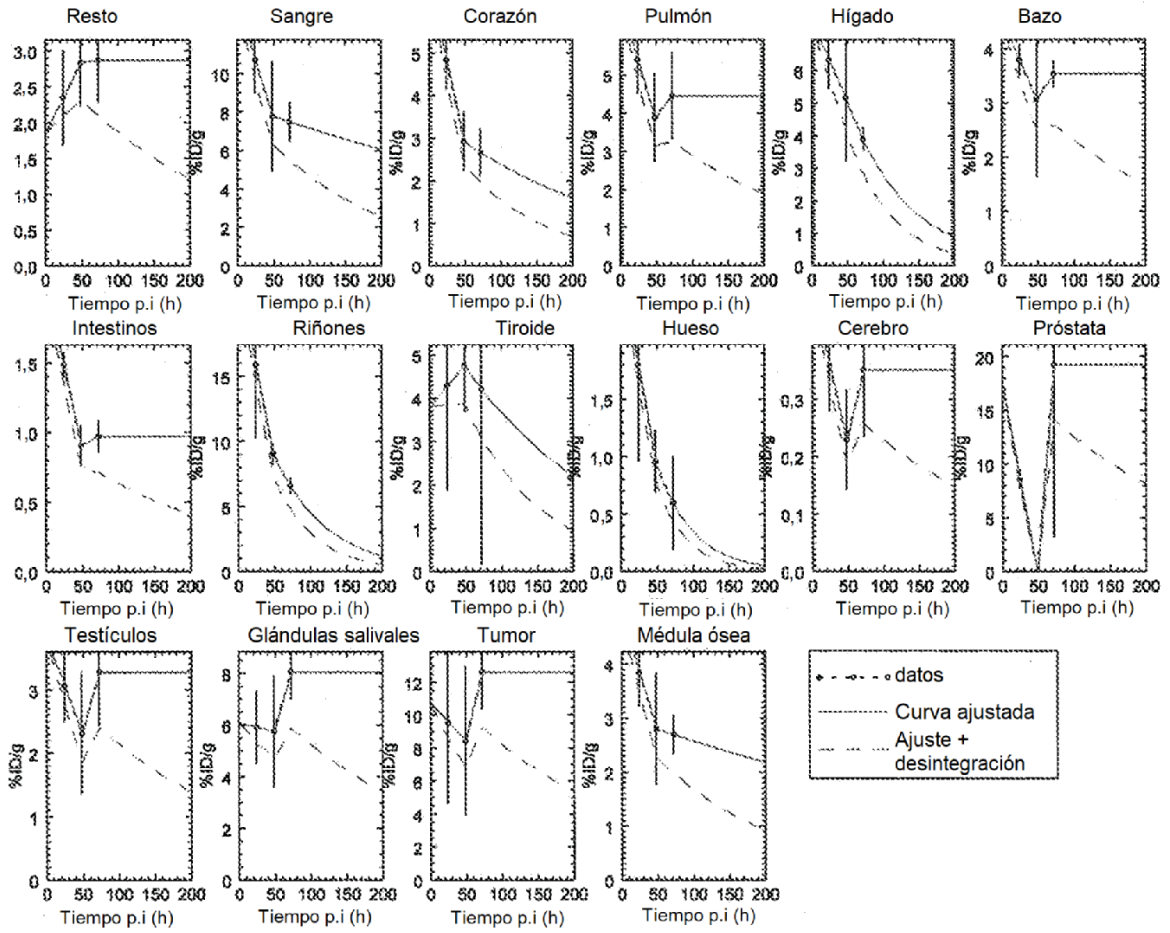


FIGURA 9(B)

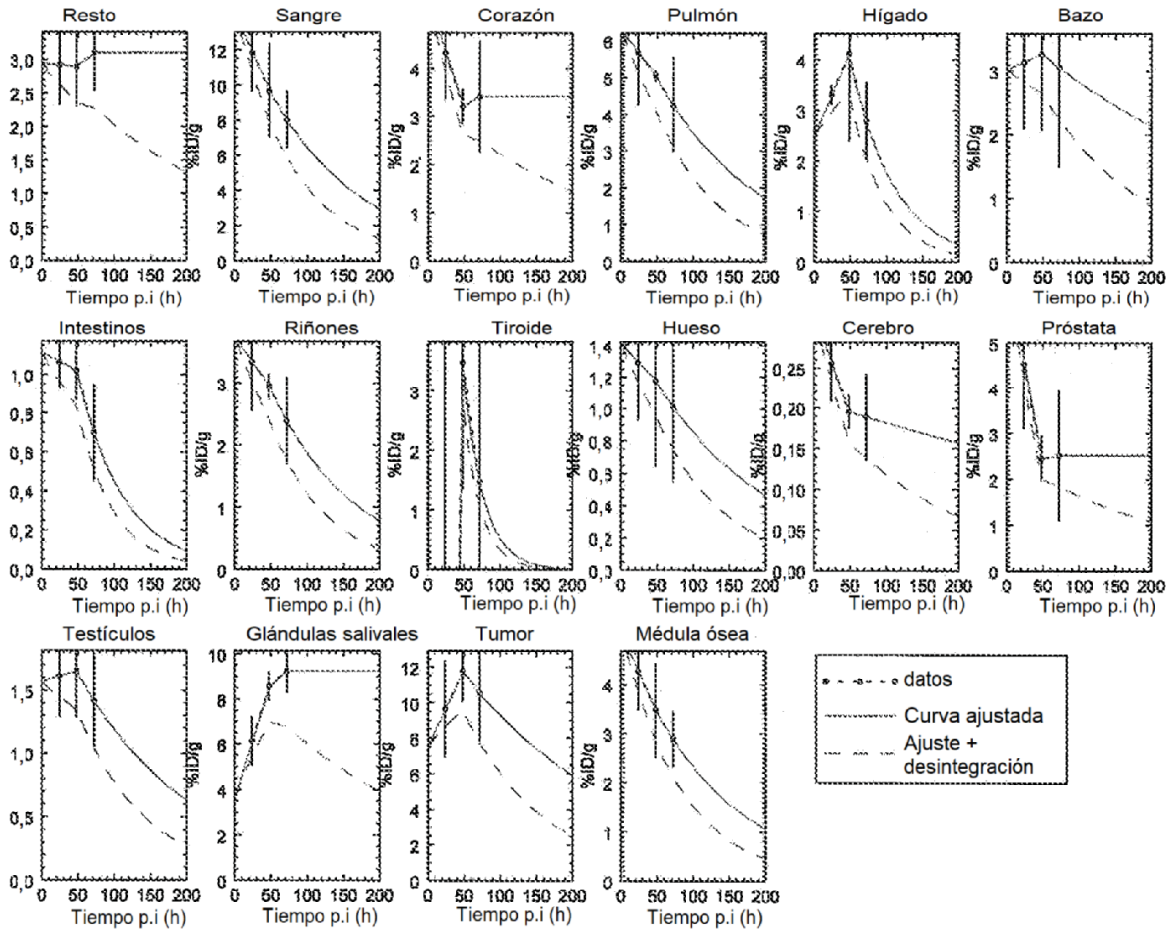


FIGURA 10

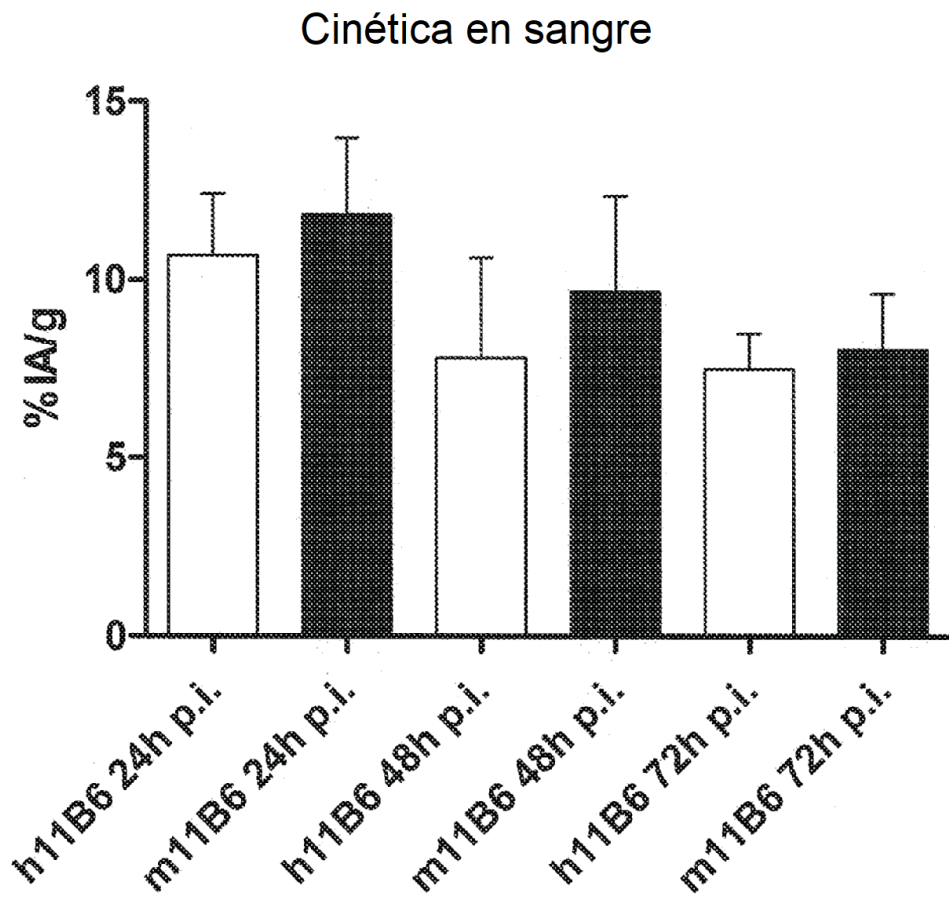


FIGURA 11



FIGURA 12(A)

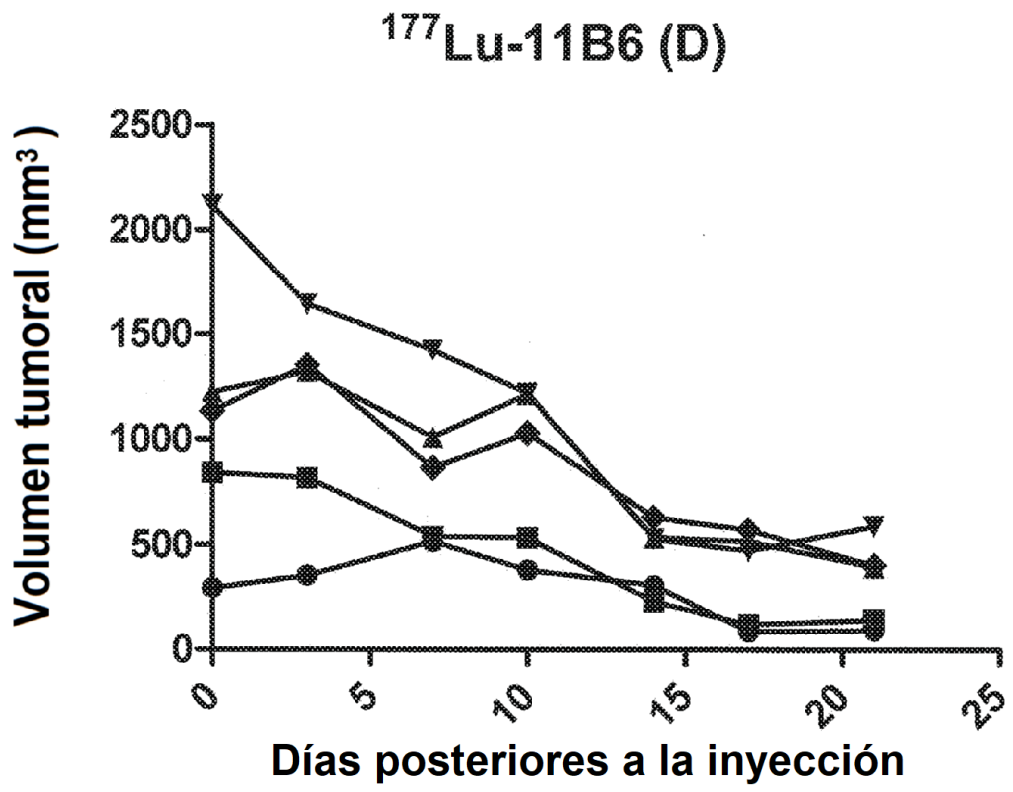


FIGURA 12(B)

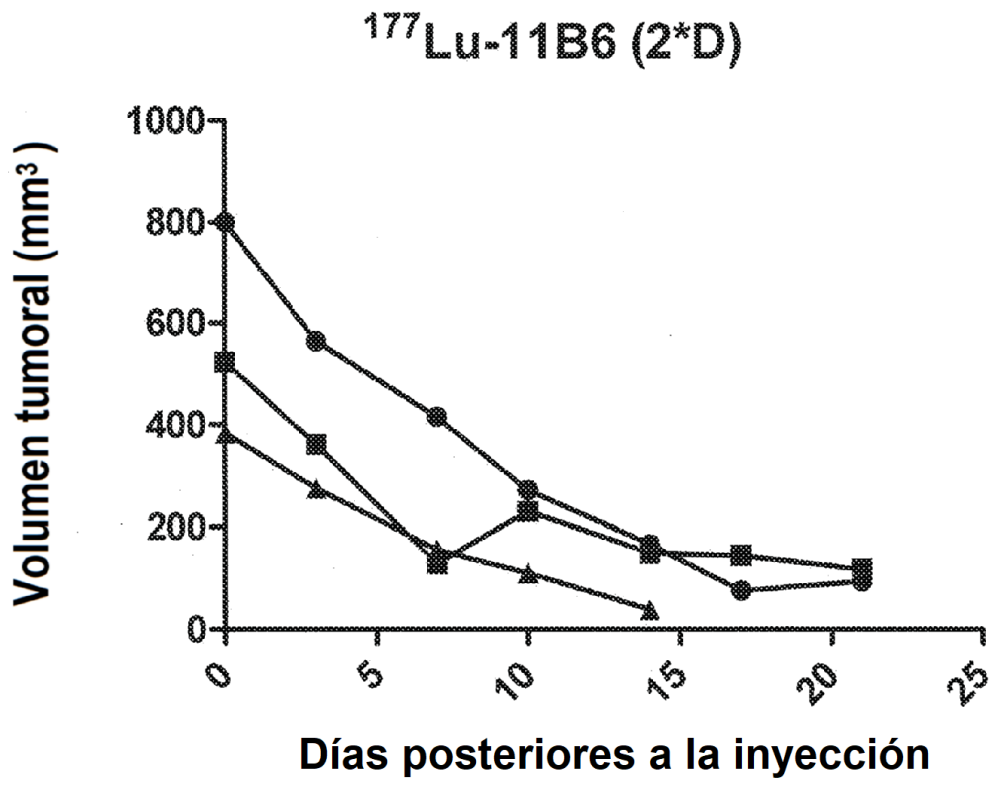


FIGURA 12(C)

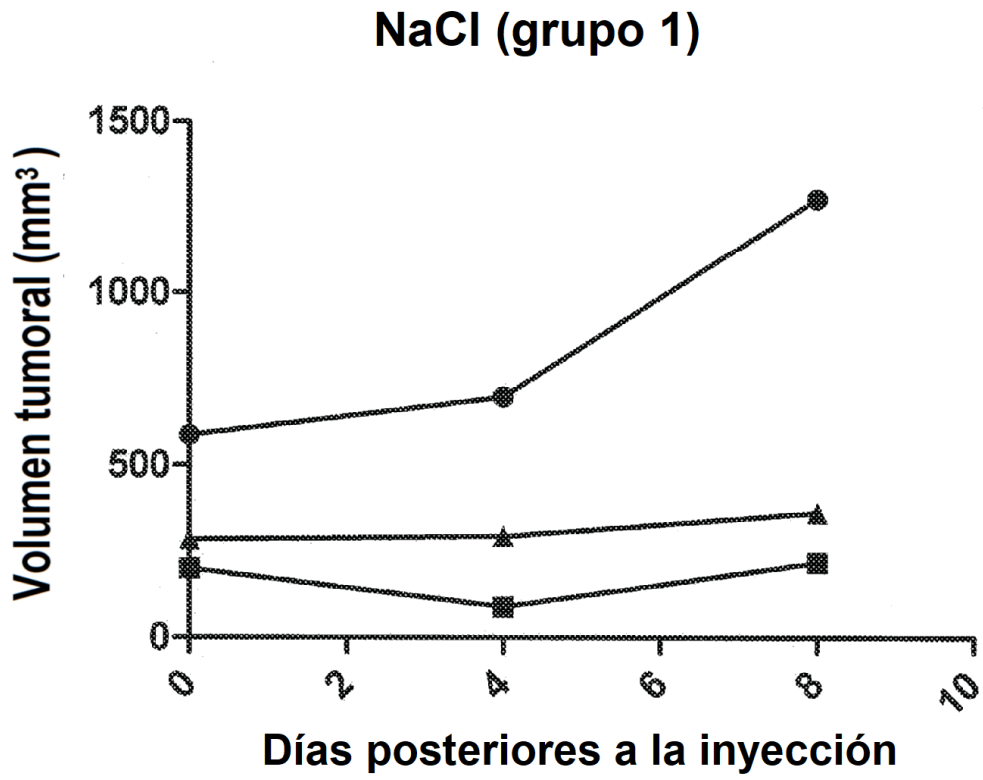
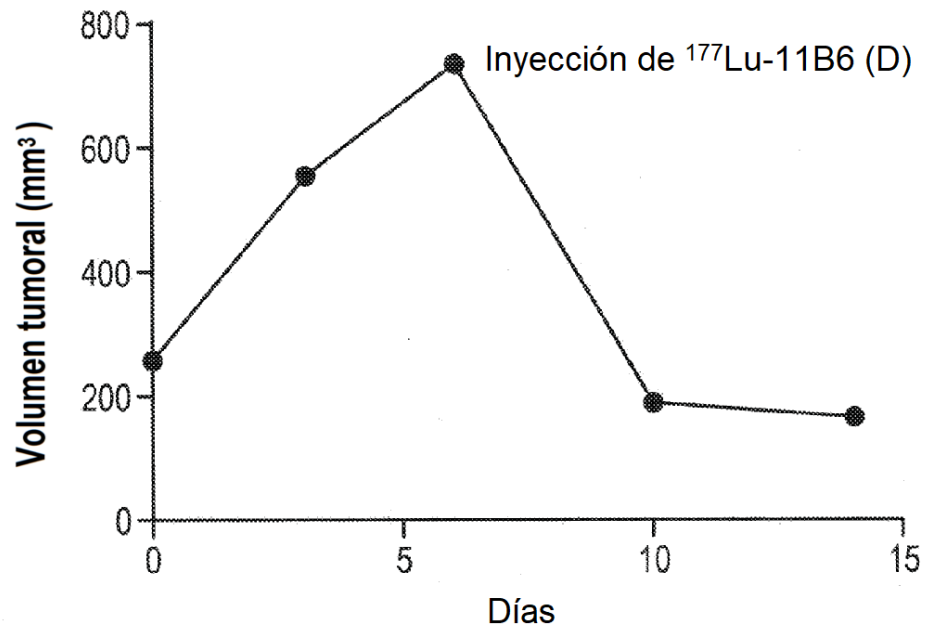


FIGURA 13

(A)



(B)

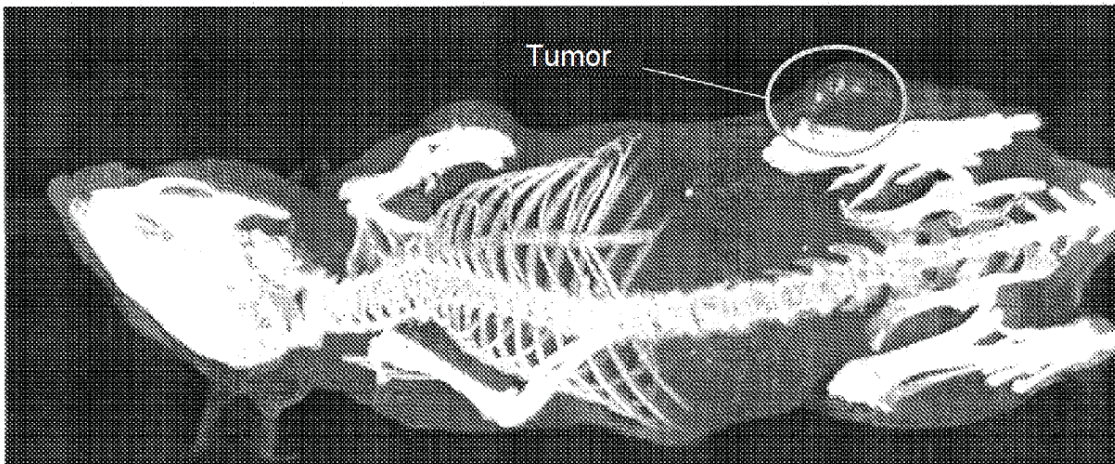


FIGURA 14(A)

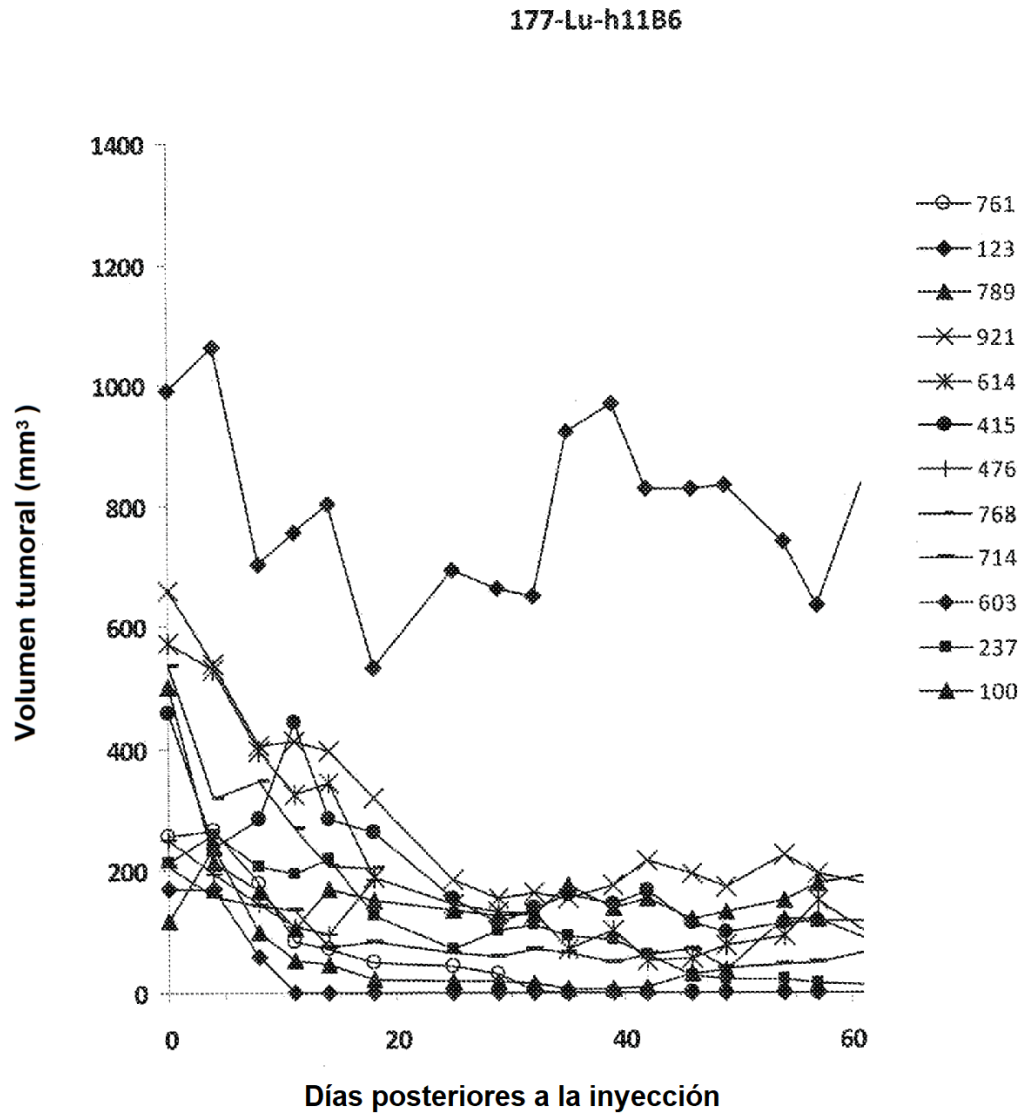


FIGURA 14(B)

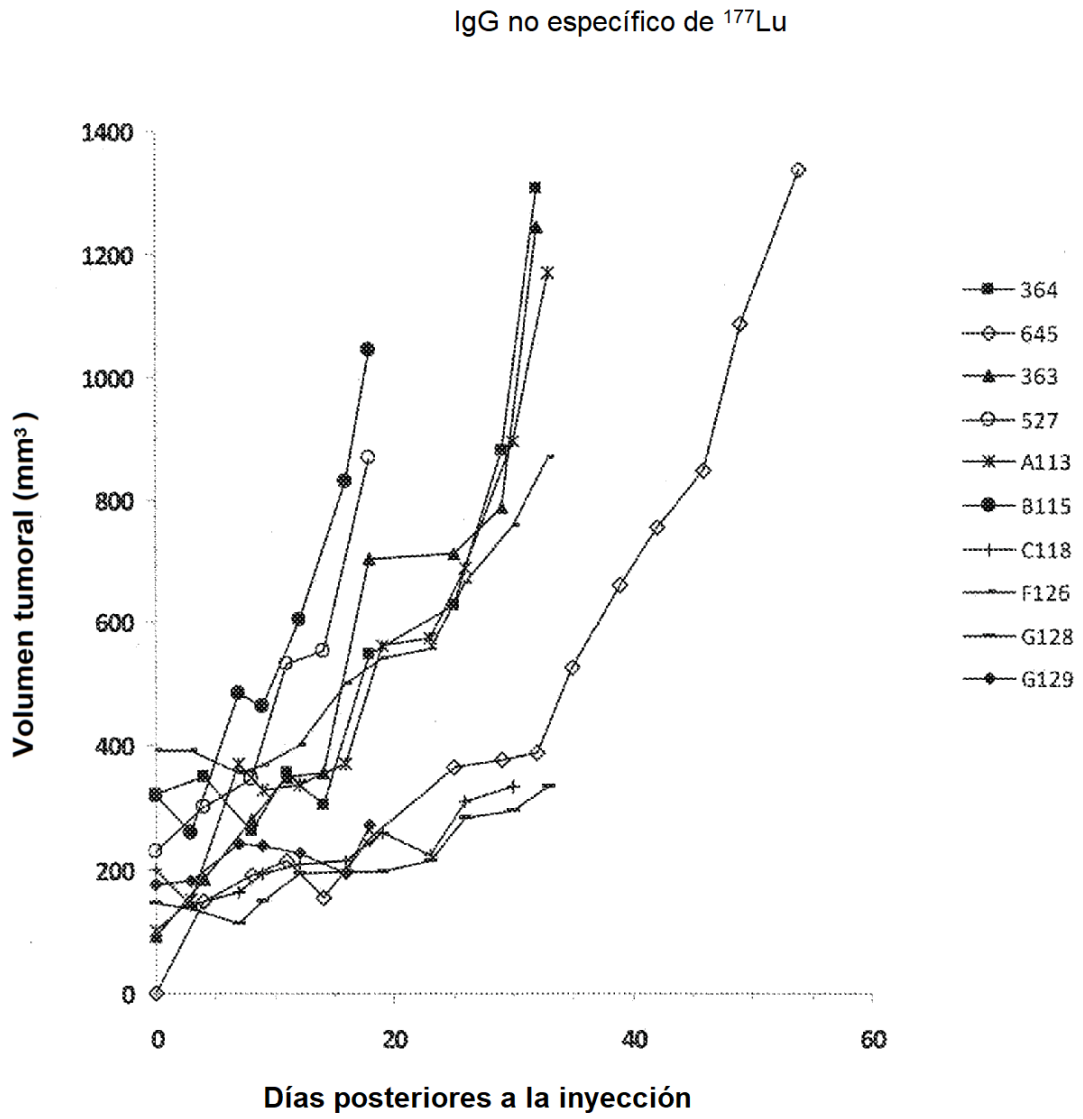


FIGURA 14(C)

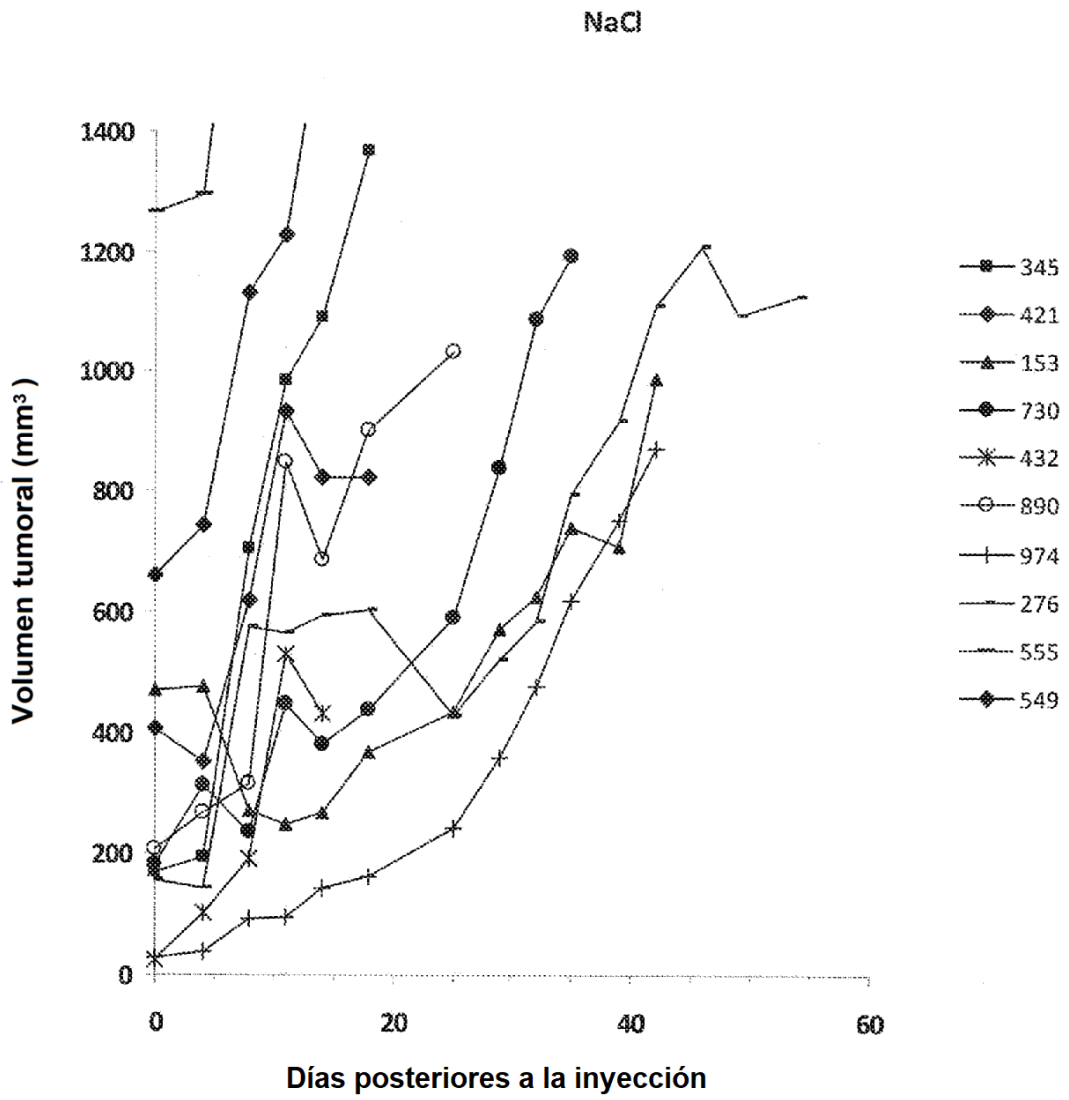


FIGURA 15

